

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

PCT

特許協力条約に基づいて公開



WO 9606172A1

|   |  |    |  |
|---|--|----|--|
| (51) 国際特許分類6<br><b>C12N 15/53, 9/02, C12P 7/26, C12N 1/21</b>   |  | A1 | (11) 国際公開番号<br><b>WO 96/06172</b>  |
|   |  |    | (43) 国際公開日<br><b>1996年2月29日(29.02.96)</b>  |
| (21) 国際出願番号<br><b>PCT/JP95/01640</b><br>(22) 国際出願日<br><b>1995年8月18日(18.08.95)</b><br>(30) 優先権データ<br>特願平6/198775 1994年8月23日(23.08.94) JP<br>特願平6/223798 1994年9月19日(19.09.94) JP<br>特願平7/47266 1995年3月7日(07.03.95) JP<br>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)<br>麒麟麦酒株式会社(KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP]<br>〒104 東京都中央区新川二丁目10番1号 Tokyo, (JP)<br>(72) 発明者: および<br>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ)<br>梶原 将(KAJIWARA, Susumu)[JP/JP]<br>〒158 東京都世田谷区奥沢5-11-9 Tokyo, (JP)<br>三沢典彦(MISAWA, Norihiko)[JP/JP]<br>近藤恵二(KONDO, Keiji)[JP/JP]<br>〒236 神奈川県横浜市金沢区福浦1-13-5<br>麒麟麦酒株式会社 基盤技術研究所内 Kanagawa, (JP)   |  |    | (74) 代理人<br>弁理士 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.)<br>〒105 東京都港区虎ノ門二丁目7番7号<br>虎ノ門中田ビル2F Tokyo, (JP)<br>(81) 指定国<br>AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KG, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, US, UZ, VN, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許(KE, MW, SD, SZ, UG).<br><br>添付公開書類<br>国際調査報告書 |
| (54) Title : <b>KETO GROUP INTRODUCING ENZYME, DNA CODING FOR THE SAME, AND PROCESS FOR PRODUCING KETOCAROTENOID</b><br>(54) 発明の名称 <b>ケト基導入酵素、それをコードするDNAおよびケトカロチノイドの製造法</b><br>(57) Abstract<br><p>A polypeptide having the enzymatic activity of converting the 4-methylene group of a <math>\beta</math>-ionone compound into a keto group; a DNA containing the base sequence coding for the above polypeptide; another DNA which hybridizes with the above DNA and contains the base sequence coding for the above polypeptide; still another DNA which has been inserted into plasmid pHP51 and contains the base sequence coding for the above polypeptide; a recombinant vector containing the above DNA(s); a microbe having the above DNA(s) introduced therein; and a process for producing a ketocarotenoid which comprises culturing the above microbe in a medium and separating the formed ketocarotenoid from the product of culture. The introduction of the above DNAs as foreign genes into microbes, such as <i>E. coli</i>, followed by expression thereof makes it possible to impart to the microbes the capability of biosynthesis of astaxanthin, 4-ketozeaxanthin, canthaxanthin, echinenone and other ketocarotenoids. The use of such microbes makes it possible to mass-produce ketocarotenoids at reduced cost and labor.</p> |  |    |  |

(57) 要約

本発明は、 $\beta$ -イオノン環を有する化合物の $\beta$ -イオノン環の4位のメチレン基をケト基に転換する酵素活性を有するポリペプチド； $\beta$ -イオノン環を有する化合物の $\beta$ -イオノン環の4位のメチレン基をケト基に転換する酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含むDNA；該DNAにハイブリダイズし、 $\beta$ -イオノン環を有する化合物の $\beta$ -イオノン環の4位のメチレン基をケト基に転換する酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含むDNA；プラスミドpHP51に挿入されていて、 $\beta$ -イオノン環を有する化合物の $\beta$ -イオノン環の4位のメチレン基をケト基に転換する酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含むDNA；前記DNAを含む組換えベクター；前記DNAを導入した微生物；および、前記DNAを導入した微生物を培地で培養し、培養物からケトカロチノイドを採取することを特徴とする、ケトカロチノイドの製造法に関する。

$\beta$ -イオノン環の4位のメチレン基をケト基に転換する酵素をコードする本発明のDNAを外来遺伝子として大腸菌等の微生物に導入し、発現させることにより、大腸菌等の微生物にアスタキサンチン、4-ケトゼアキサンチン、カンタキサンチン、エキネノン、その他のケト基を含むケトカロチノイドの生合成能を付与することが可能となった。ケト基を含むケトカロチノイドの生合成能を付与された大腸菌等の微生物を用いることにより、ケト基を含むケトカロチノイドを少ない労力およびコストで大量に製造することができる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

|    |           |    |             |    |          |    |            |
|----|-----------|----|-------------|----|----------|----|------------|
| AL | アルバニア     | DK | デンマーク       | LK | スリランカ    | PT | ポルトガル      |
| AM | アルメニア     | DE | エストニア       | LR | リベリア     | RO | ルーマニア      |
| AT | オーストリア    | ES | スペイン        | LS | レソト      | RU | ロシア連邦      |
| AU | オーストラリア   | FI | フィンランド      | LT | リトアニア    | SD | スーダン       |
| AZ | アゼルバイジャン  | FR | フランス        | LU | ルクセンブルグ  | SE | スウェーデン     |
| BB | バルバドス     | GA | ガボン         | LV | ラトヴィア    | SG | シンガポール     |
| BE | ベルギー      | GB | イギリス        | MC | モナコ      | SI | スロヴェニア     |
| BF | ブルキナ・ファソ  | GE | グルジア        | MD | モルドバ     | SK | スロヴァキア共和国  |
| BG | ブルガリア     | GN | ギニア         | MG | マダガスカル   | SN | セネガル       |
| BJ | ベナン       | GR | ギリシャ        | MK | マケドニア共和国 | SZ | スワジランド     |
| BR | ブラジル      | HU | ハンガリー       |    | スラヴィア共和国 | TD | チャード       |
| BY | ベラルーシ     | IE | アイルランド      | ML | マリ       | TG | トゴ         |
| CA | カナダ       | IS | アイスランド      | MN | モンゴル     | TJ | タジキスタン     |
| CF | 中央アフリカ共和国 | IT | イタリア        | MR | モーリタニア   | TM | トルクメニスタン   |
| CG | コンゴ       | JP | 日本          | MW | マラウイ     | TR | トルコ        |
| CH | スイス       | KE | ケニア         | MX | メキシコ     | TT | トリニダード・トバゴ |
| CI | コート・ジボワール | KG | キルギスタン      | NE | ニジェール    | UA | ウクライナ      |
| CM | カメルーン     | KP | 朝鮮民主主義人民共和国 | NL | オランダ     | UG | ウガンダ       |
| CN | 中国        | KR | 大韓民国        | NO | ノルウェー    | US | 米国         |
| CZ | チェコ共和国    | KZ | カザフスタン      | NZ | ニュージーランド | UZ | ウズベキスタン共和国 |
| DE | ドイツ       | LI | リヒテンシュタイン   | PL | ポーランド    | VN | ヴェトナム      |

## 明 細 書

ケト基導入酵素、それをコードするDNAおよびケトカロチノイドの製造法

## 技術分野

本発明は、鯛、鮭、海老等の養殖魚介類の色揚げに有用であり、また着色料や抗酸化剤として食品に利用されるアスタキサンチン等のケトカロテノイドの合成に必要なケト基導入酵素、それをコードするDNA、該DNAを含む組換えベクター、該DNAを導入した微生物、および該微生物を利用したケトカロテノイドの製造法に関するものである。

## 背景技術

ケトカロチノイドとは、ケト基を含むカロチノイド色素の総称である。カロチノイドは、メバロン酸を出発物質として、ステロイドやテルペンノイドと途中まで共通なイソプレノイド生合成経路によって合成される（第6図参照）。イソプレレン基本生合成系により生じる、基本単位のC5のイソペンテニルピロリン酸（IPP）とその異性体であるジメチルアリルピロリン酸（DMAPP）が縮合してC10のゲラニルピロリン酸（GPP）が生成され、更にIPPが縮合してC15のファネルシルピロリン酸（FPP）が生成される。FPPは、再度IPPと縮合することによってC20のゲラニルゲラニルピロリン酸（GGPP）を生じ、次にGGPP同士が縮合して、最初のカロチノイドである無色のフィトエンが作られる。フィトエンは、一連の不飽和反応により、フィトフルエン、 $\alpha$ -カロチン、ノイロスポレン、リコピンに変換される。続いて、リコピンが環化反応により、2つの $\beta$ -イオノン環を有する $\beta$ -カロチンに変換され、最後に、 $\beta$ -カロチンにケト基や水酸基などが導入されて、アスタキサンチンやゼアキサンチン等が合成されていると考えられている（Britton, G., "Biosynthesis of carotenoids". Plant Pigments. London, Academic Press, 1988, p. 133-182. (Goodwin, T.W. ed.) 参照）。

最近、発明者等は、植物常在非光合成細菌*Erwinia uredovora*のカロチノイド生合成遺伝子群を、その黄色の色調を指標にして、大腸菌の染色体DNAライブラリーからクローニングした。さらに、これらの遺伝子の色々な組合わせを大腸菌

等の微生物で発現させることにより、大腸菌等の微生物にフィトエン、リコピン、 $\beta$ -カロチン、及び $\beta$ -カロチンに水酸基が導入された黄色のカロチノイド色素であるゼアキサンチンを生産させることを可能にした（第7図参照）（Misawa, N., Nakagawa, M., Kobayashi, K., Yamano, S., Izawa, Y., Nakamura, K., Harashima, K., "Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli*.", J. Bacteriol., 172, p.6704-6712, 1990.、Misawa, N., Yamano, S., Ikenaga, H., "Production of  $\beta$ -carotene in *Zymomonas mobilis* and *Agrobacterium tumefaciens* by introduction of the biosynthesis genes from *Erwinia uredovora*.", Appl. Environ. Microbiol., 57, p.1847-1849, 1991 及び特開平3-58786号公報参照）。

ところで、赤色のケトカロチノイドであるアスタキサンチンは、特に海洋生物の鯛、鮭等の赤色魚類や、蟹、海老等の甲殻類に広く存在する代表的な動物カロチノイドである。一般に、動物はカロチノイドを生合成することができないので、微生物や植物によって合成されたカロチノイドを外界より摂取する必要がある。そのため、従来より鯛、鮭、海老等の養殖魚介類の色揚げの目的にアスタキサンチンは広く用いられてきた。

また、アスタキサンチンは食品用着色料として使用されている他、癌の原因となる生体内で発生する活性化酸素を除去する抗酸化剤としても注目を集めている（松野隆男、幹渉、「動物におけるカロチノイドの生理機能と生物活性」化学と生物、28, p.219-227, 1990参照）。

アスタキサンチンの供給源としては、南極オキアミ等の甲殻類、酵母*Phaffia*の培養物、緑藻*Haematococcus*の培養物、及び有機合成法により得られた化合物が知られている。しかし、南極オキアミ等の甲殻類を用いる場合、その摂取や抽出の際に脂質を始めとする夾雑物との分離が困難であり、多大な労力とコストを要する。酵母*Phaffia*の培養物でも、その細胞壁が強固でしかもアスタキサンチンの生産量が低いため、摂取や抽出に多大なコストを要する。また、緑藻*Haematococcus*の培養物の場合、培養時にアスタキサンチン合成に不可欠な光を供給しなければならず、太陽光摂取のための立地条件や人工光供給のための培養装置等



の設備が必要であり、さらに混在するクロロフィルや副生産物の脂肪酸エステルとの分離が困難である。これらのことから上記の生物起源のアスタキサンチンは、コスト的に有機合成法により得られたものに勝てないのが現状であった。しかしながら、有機合成法による場合、アスタキサンチンが魚介類の飼料や食品添加物として用いられることを考慮すると、反応時に生ずる副生成物等の面で問題が残る、かつ消費者の天然物嗜好にも反している。

以上のことより、昨今、安全でかつ消費者の天然物嗜好に合致した生物起源の安価なアスタキサンチンの製造法の開発が望まれている。

そこで、アスタキサンチンの生合成を担う遺伝子群を取得することができれば非常に有用であると考えられる。なぜなら、アスタキサンチンの生産能の有無にかかわらず、食品としての安全性やアスタキサンチンの潜在的生産能の面で最適な微生物にアスタキサンチン合成遺伝子群を導入、発現させることにより、その生産能を微生物に与えることができるからである。この場合、混在する副生産物の問題もなく、今日の進歩した遺伝子操作の手法をもってすれば、有機合成法を凌駕するレベルまでアスタキサンチンの生産量を上げることも難しくないと考えられる。ゼアキサンチンまでを合成する遺伝子群は、前述したように、発明者等により、すでに非光合成細菌 *Brwinia uredovora* から取得されている。しかしながら、アスタキサンチンを合成するのに必要なケト基導入酵素をコードする遺伝子等の取得は、前述したようなアスタキサンチンの産業上の有用性の故に、多くの研究機関で試みられてきているにもかかわらず、未だ誰も成功に至っていないのが現状である。この原因としては、ケト基導入酵素等のカロチノイド生合成に関与する下流の酵素は膜タンパク質であり、それらの酵素の精製や活性測定が不可能であったために、それらの酵素の知見が無かったことが挙げられる。特に、ケト基導入酵素については、酵素の知見だけでなく、それをコードする遺伝子の知見も皆無であった。したがって、今日まで、アスタキサンチンを遺伝子工学的手法を用いて、微生物等に生産させることは不可能であった。

#### 発明の開示

従って、本発明は、アスタキサンチンを始めとするケト基を含むケトカロチノ

イドを生産するために必要なケト基導入酵素をコードする遺伝子を提供することを目的とする。

また、本発明は、ケト基導入酵素を提供することも目的とする。

さらに、本発明は、前記のケト基導入酵素をコードする遺伝子を含む組換えベクターを提供することも目的とする。

さらにまた、本発明は、前記のケト基導入酵素をコードする遺伝子を導入した微生物を提供することも目的とする。

また別に、本発明は、前記のケト基導入酵素をコードする遺伝子を導入した微生物を利用するケトカロチノイドの製造法を提供することも目的とする。

本発明者等は、上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、緑藻*Haematococcus pluvialis* の cDNA からケト基導入酵素をコードする遺伝子をクローニングし、該遺伝子を組み込んだベクターDNA を作製し、該ベクターDNA を大腸菌に導入し、かくして得られた大腸菌を培養した培地からエキネノン、カンタキサンチン、アスタキサンチン、4-ケトゼアキサンチン等のケトカロチノイドを採取することに成功し、本発明を完成させるに至った。すなわち、本発明は、 $\beta$ -イオノン環を有する化合物の $\beta$ -イオノン環の4位のメチレン基をケト基に転換する酵素活性を有するポリペプチドを提供する。また、本発明は、 $\beta$ -イオノン環を有する化合物の $\beta$ -イオノン環の4位のメチレン基をケト基に転換する酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含むDNAを提供する。さらに、本発明は、前記のDNAを含む組換えベクターを提供する。さらにまた、本発明は、前記のDNAを導入した微生物も提供する。また別に、本発明は、前記のDNAを導入した微生物を培地で培養し、培養物からケトカロチノイドを採取することを特徴とする、ケトカロチノイドの製造法を提供する。

以下、本発明を詳細に説明する。

#### 1. ケト基導入酵素

本発明のケト基導入酵素は、 $\beta$ -イオノン環を有する化合物の $\beta$ -イオノン環の4位のメチレン基をケト基に転換する酵素活性を有するポリペプチドである。このポリペプチドは、実質的に配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列（第

1 図の A から D までのアミノ酸配列)、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列 (第 2 図の B から D までのアミノ酸配列)、または、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列 (第 3 図の C から D までのアミノ酸配列) を含むものであってもよい。ここで、「実質的に配列表の配列番号 1、配列番号 2、または、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列」とは、配列表の配列番号 1、配列番号 2、または、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列の他、 $\beta$ -イオノン環を有する化合物の  $\beta$ -イオノン環の 4 位のメチレン基をケト基に転換する酵素活性を有する限りにおいて、配列表の配列番号 1、配列番号 2、または、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列のいくつかについて欠失、置換、付加等の変異があってもよいアミノ酸配列を意味する。たとえば、配列表の配列番号 1、配列番号 2、または配列番号 3 に示されるアミノ酸配列の第 1 番目のアミノ酸 (Met) が欠失しているものなども包含される。

本発明のケト基導入酵素は、ある実施態様において、 $\beta$ -カロチンを基質としてエキネノンを経てカンタキサンチンを合成することができる。また、3-ヒドロキシ- $\beta$ -イオノン環の 4 位のメチレン基をケト基に転換することもできる。その具体的な例の 1 つとして、ゼアキサンチンを基質として 4-ケトゼアキサンチンを経てアスタキサンチンを合成することができる (第 8 図参照)。カロチノイドである  $\beta$ -カロチンやゼアキサンチンは 1 分子中に 2 分子の  $\beta$ -イオノン環を有しているので、まず 4 位のメチレン基がケト基に転換されることにより、それぞれエキネノン及び 4-ケトゼアキサンチンが生じ、更に  $\beta$ -イオノン環の 4' 位 (4 位と同等) のメチレン基がケト基に転換されることにより、それぞれカンタキサンチン及びアスタキサンチンが生じるからである。

## 2. ケト基導入酵素遺伝子 (bkt)

本発明のケト基導入酵素をコードする遺伝子 (以下、「bkt」と称する。) は  $\beta$ -イオノン環を有する化合物の  $\beta$ -イオノン環の 4 位のメチレン基をケト基に転換する酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含む DNA である。この典型的な例は、緑藻 *Haematococcus pluvialis* (NIES-144) よりクローニングできる bkt 遺伝子であり、これは実質的に第 1 図の A から D までのアミノ酸配列 (配列表の配列番号 1 に示されるアミノ酸配列)、第 2 図の B から D までのアミノ酸配列 (配列表の配列番号 2 に示されるアミノ酸配列)、または第 3 図の



CからDまでのアミノ酸配列（配列表の配列番号3に示されるアミノ酸配列）を含むポリペプチドをコードする塩基配列を含むDNAである。配列表の配列番号1、配列番号2、および配列番号3に示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列の一例を、それぞれ、配列表の配列番号4と5、6、および7に示す。なお、配列表の配列番号4に示す塩基配列は、コード領域である配列表の配列番号5に示す塩基配列の上流に非コード領域を含むものである。また、本発明のbkt遺伝子は、配列表の配列番号4、5、6、および7に示される塩基配列を含むものの他に、縮重コドンにおいてのみ異なる同一のポリペプチドをコードする縮重異性体を含むものも包含することはいうまでもない。

bkt遺伝子産物（以下、「BKT」と称する。）、すなわち、本発明のケト基導入酵素は、前記したように、 $\beta$ -イオノン環を有する化合物の $\beta$ -イオノン環の4位のメチレン基をケト基に転換する酵素活性を有しており、ある実施態様において、 $\beta$ -カロチンを基質としてエキネノンを経てカンタキサンチンを合成することができる（第8図参照）。また、BKTは、3-ヒドロキシ- $\beta$ -イオノン環の4位のメチレン基をケト基に転換することもでき、例えば、ゼアキサンチンを基質として4-ケトゼアキサンチンを経てアスタキサンチンを合成することができる（第8図参照）。なお、このような酵素活性を有するポリペプチド及びこれをコードするDNAは、従来知られていなかったものであり、このポリペプチドおよびこれをコードするDNAは、現在までに知られているどのようなポリペプチドおよびDNAとも全体的なホモロジーは有していない。また、 $\beta$ -イオノン環や3-ヒドロキシ- $\beta$ -イオノン環に限らず、1つの酵素がメチレン基をいきなりケト基に変換するという知見は今まで存在しなかったものである。

ところで、非光合成細菌 *Erwinia* のカロチノイド合成遺伝子群、crtE、crtB、crtI 及びcrtYを用いることにより、大腸菌等の微生物に $\beta$ -カロチン生産能を与えることができ、更に上記の4つの遺伝子に加えcrtZ遺伝子も用いることにより、大腸菌等の微生物にゼアキサンチン生産能を与えることができる（第7図及び前記のW091/13078号公開公報参照）。

したがって、BKTの基質である $\beta$ -カロチンやゼアキサンチンはこれら*Erwinia* の crt遺伝子群により供給されるので、*Erwinia* の crt 遺伝子群を保持する大腸

菌等の微生物に更に本発明のDNA (bkt遺伝子)を導入すると、 $\beta$ -カロチン産生微生物ではエキネノンを経てカンタキサンチンを、ゼアキサンチン産生微生物では4-ケトゼアキサンチンを経てアスタキサンチンを生産することが可能となる(第8図参照)。ただし、ゼアキサンチン産生微生物では、ゼアキサンチンの中間代謝産物として $\beta$ -クリプトキサンチンが微量含まれることから、さらにこの $\beta$ -クリプトキサンチンを基質として、上記の主要代謝経路の他に、 $\beta$ -クリプトキサンチンから3-ヒドロキシエキネノン、4-ケトゼアキサンチンを経てアスタキサンチンを生産する経路および $\beta$ -クリプトキサンチンから3-ヒドロキシエキネノンまたは3'-ヒドロキシエキネノンを経てフェニコキサンチンを生産する経路も存在すると考えられ、このマイナーな代謝経路の産物として、3'-ヒドロキシエキネノン、3-ヒドロキシエキネノン及びフェニコキサンチンを生産することができると考えられる(第9図参照)。

### 3. DNAの取得

本発明のケト基導入酵素BKTのアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むDNAを取得する一つの手段は、核酸合成の方法に従って、その鎖長の少なくとも一部を化学合成することである。しかし、結合アミノ酸が多数であるということを考えれば、この化学合成法よりも緑藻 *Haematococcus* (代表的なものに *Haematococcus pluvialis* や *Haematococcus lacustris* 等がある) からmRNAを取得し、それから大腸菌で cDNAライブラリーを作製し、このライブラリーから遺伝子工学の分野で慣用されている方法、たとえば適当なプローブによるハイブリダイゼーション法または本発明者等が用いた発現クローニング法により、これを取得するほうが好ましいと言える。

具体的には、*Haematococcus pluvialis* の全RNAを分離し、オリゴテックス-dT30スーパー(宝酒造(株))を用いてポリA<sup>+</sup> RNAを精製する。このポリA<sup>+</sup> RNAを鋳型にして、逆転写酵素SUPERScript RT (GIBCO BRL)で相補鎖DNAを合成し、続いて*E. coli* DNA リガーゼ、*E. coli* DNA ポリメラーゼ、*E. coli* DNA RNase H (全てGIBCO BRL)を用いて2本鎖cDNAを合成する。合成したcDNAを大腸菌用発現ベクターpSPORT1(GIBCO BRL)に組み込み、cDNAライブラリーを作製する。このcDNAライブラリーを用い、 $\beta$ -カロチンを産

生する大腸菌（上記した*Erwinia* のcrt 遺伝子群を保持する大腸菌）を形質転換する。得られた形質転換体の色調変化から、ケト基導入酵素遺伝子を保持した大腸菌をスクリーニングする。この方法は、ケト基が導入され、ケトカロチノイドのひとつであるカンタキサンチンが合成されると大腸菌の色調が $\beta$ -カロチンの黄色からカンタキサンチンの赤色に変わることを利用したものである。得られた赤色の形質転換大腸菌から目的のcDNAを持つプラスミドを単離し、cDNAを大腸菌ベクターpBluescript II SK+およびpBluescript II KS+(STRATAGENE)につなぎ換える。これらプラスミドについて種々の長さの欠失を有する欠失変異体作成を行い、それらについて塩基配列の決定を行う。

#### 4. bkt遺伝子にハイブリダイズするDNA

現在までに数種類の緑藻*Haematococcus* が分離、同定されており、これらは全てアスタキサンチン等のケトカロチノイドを合成すると考えられている。また、酵母ではあるが同じ真核生物の*Phaffia rhodozyma* もアスタキサンチン等のケトカロチノイドを合成することが報告されている(Johnson, B. A. and An, G.-Hwan, "Astaxanthin from microbial sources", Critical Reviews in Biotechnology, 11, 297-326, 1991)。前述した*Haematococcus pluvialis* NIES-144のbkt遺伝子をプローブとして用い、そのホモロジーを利用したハイブリダイゼーションによって他の上記アスタキサンチン産生藻類あるいは微生物から、ケト基導入酵素の遺伝子を取得することができる。発明者等は、アスタキサンチンを合成できる*Haematococcus* の中から、*Haematococcus pluvialis* NIES-144とはその資化性や光に対する表現型の異なる2種、すなわち、*Haematococcus lacustris* UTEX 294 (The Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austinから分譲)、*Haematococcus lacustris* C-392 [東京大学応用微生物研究所(現分子細胞生物学研究所) 附属微生物微細藻類総合センターより分譲] を選択し、これらの染色体DNAを調製し、*Haematococcus pluvialis* NIES-144のbkt遺伝子をプローブとして、サザンハイブリダイゼーションを行った。その結果は発明者等の予想通り、bktのプローブは2種類の緑藻*Haematococcus* のいずれの染色体DNAに由来する特定のDNA断片にも強くハイブリダイズした。従って本発明は、このような前記DNA（配列番号4、5、6及び7）とハイブリダイズす

るDNAをも包含する。

#### 5. 大腸菌等の微生物の形質転換

本発明のDNAを外来遺伝子として適当な細菌（例えば、大腸菌、*Zymomonas mobilis*、*Agrobacterium tumefaciens*）や酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）等の微生物に導入して発現させることにより、種々のケトカロチノイドを製造することができる。

以下に、好ましい微生物への外来遺伝子の導入法の概要について記載する。大腸菌等の微生物への外来遺伝子の導入および発現のための手順ないし方法としては、本明細書において記載したもの以外にも、遺伝子工学の分野により慣用されているもの、例えば、"Vectors for cloning genes", *Methods in Enzymology*, 216, p. 469-631, 1992, Academic Press、および、"Other bacterial systems", *Methods in Enzymology*, 204, p. 305-636, 1991, Academic Press 参照）に準じた手法ないし方法を用いることができる。

##### <大腸菌への遺伝子導入>

大腸菌への外来遺伝子の導入法としては、ハナハンの方法、ルビジウム法などすでに確立されたいくつかの効率的方法があり、それらを用いることができる

（例えば、Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., "Molecular cloning -A laboratory manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第1章第74頁～第84頁, 1989 参照）。大腸菌で外来遺伝子を発現させるためには、常法に従い（例えば、前述の "Molecular cloning -A laboratory manual. 第17章第3頁～第41頁"）。

参照）、例えば、lac のプロモーターを有する大腸菌発現ベクターに外来遺伝子を挿入したものを大腸菌に導入するとよい。本発明者等は、lac のプロモーター等を有する大腸菌用 cDNA発現ベクター pSPORT1 (GIBCO BRL 社) 中に、lac のプロモーターの転写のリードスルーを受ける方向に、*Haematococcus* のbkt 遺伝子を挿入し、これを大腸菌に導入した。

##### <酵母への遺伝子導入>

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* への外来遺伝子の導入法としては、リチウム法などすでに確立された方法があり、それを用いることができる（例えば、秋

山裕一監修バイオインダストリー協会編集、「酵母のニューバイオテクノロジー」医学出版センター 刊参照）。酵母で外来遺伝子を発現させるためには、PGK や GPD 等のプロモーターおよびターミネーターを用いて、外来遺伝子をこのプロモーターとターミネーターの間に転写のリードスルーを受けるように挿入した発現カセットを構築し、この発現カセットを、*S. cerevisiae* のベクター、たとえば、YRp系（酵母染色体のARS配列を複製起点とする酵母用マルチコピーベクター）、YE<sub>p</sub>系（酵母の2 $\mu$ m DNAの複製起点を持つ酵母用マルチコピーベクター）、YIp系（酵母の複製起点を持たない酵母染色体組込み用ベクター）等のベクターに挿入し、これを酵母に導入するとよい（前述の「酵母のニューバイオテクノロジー」医学出版センター刊、日本農芸化学会ABCシリーズ「物質生産のための遺伝子工学」朝倉書店刊、および、Yamano, S., Ishii, T., Nakagawa, M., Ikenaga, H., Misawa, N., "Metabolic engineering for production of  $\beta$ -carotene and lycopene in *Saccharomyces cerevisiae*". *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, P.1112-1114, 1994 参照）。

#### <Zymomonas mobilisへの遺伝子導入>

エタノール生産細菌 *Zymomonas mobilis* への外来遺伝子の導入は、グラム陰性菌に共通な接合伝達法により行うことができる。*Zymomonas mobilis*で外来遺伝子を発現させるためには、外来遺伝子を挿入した発現ベクター（たとえば、*Zymomonas mobilis* 用ベクターpZA22）を *Zymomonas mobilis*に導入するとよい

（中村克己、「*Zymomonas* 細菌の分子育種」、日本農芸化学会誌, 63, p.1016-1018, 1989、および、Misawa, N., Yamano, S., Ikenaga, H., "Production of  $\beta$ -carotene in *Zymomonas mobilis* and *Agrobacterium tumefaciens* by introduction of the biosynthesis genes from *Erwinia uredovora*". *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, p.1847-1849, 1991参照）。

#### <Agrobacterium tumefaciensへの遺伝子導入>

植物病原細菌 *Agrobacterium tumefaciens* への外来遺伝子の導入は、グラム陰性菌に共通な接合伝達法により行うことができる。*Agrobacterium tumefaciens* で外来遺伝子を発現させるためには、外来遺伝子を挿入した発現ベクター

（たとえば、*Agrobacterium tumefaciens* 用ベクターpBI121）を *Agrobacterium*



tumefaciensに導入するとよい (Misawa, N., Yamano, S., Ikenaga, H., "Production of  $\beta$ -carotene in *Zymomonas mobilis* and *Agrobacterium tumefaciens* by introduction of the biosynthesis genes from *Erwinia uredovora*". Appl. Environ. Microbiol., 57, p.1847-1849, 1991 参照)。

#### 6. 微生物によるケトカロチノイド生産 (bkt 遺伝子発現)

前述した、微生物への外来遺伝子の導入のための手法ないし方法によって、緑藻 *Haematococcus* 由来のアスタキサンチンを始めとするケトカロチノイド合成遺伝子群を導入し、これを発現させることが可能である。

ファルネシルピロリン酸 (FPP) はカロチノイドだけでなく、セスキテルペン、トリテルペン、ステロール、ホパノール等のテルペノイドと共通な基質である。一般に、微生物は、カロチノイドを合成できないものでも、テルペノイドは合成しているので、すべての微生物は基本的に中間代謝産物として FPP を有しているはずである。一方、非光合成細菌 *Erwinia* のカロチノイド合成遺伝子群は、FPP を基質として、*Haematococcus* の bkt 遺伝子産物の基質、すなわち、 $\beta$ -カロチン、ゼアキサンチンまで合成させることが可能である (第7図参照)。発明者等は、大腸菌だけでなく前記した微生物、すなわち、酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、エタノール生産細菌 *Zymomonas mobilis*、植物病原細菌 *Agrobacterium tumefaciens* に *Erwinia* の crt 遺伝子群を導入し、これらの微生物が、予想どおり、 $\beta$ -カロチン等のカロチノイドを生産できるようになることを、すでに確認している (Yamano, S., Ishii, T., Nakagawa, M., Ikenaga, H., Misawa, N., "Metabolic engineering for production of  $\beta$ -carotene and lycopene in *Saccharomyces cerevisiae*". Biosci. Biotech. Biochem., 58, p.1112-1114, 1994、Misawa, N., Yamano, S., Ikenaga, H., "Production of  $\beta$ -carotene in *Zymomonas mobilis* and *Agrobacterium tumefaciens* by introduction of the biosynthesis genes from *Erwinia uredovora*". Appl. Environ. Microbiol., 57, p.1847-1849, 1991、および、特開平3-58786号公報参照)。

したがって、*Erwinia* 由来のカロチノイド合成遺伝子群と本発明の DNA (典型的には *Haematococcus* 由来のカロチノイド合成遺伝子 bkt) を組み合わせて同一の微生物に同時に導入することにより、遺伝子導入発現系が確立しているすべ

ての微生物にアスタキサンチン等のケトカロチノイドを生産させることが可能となる。あるいは、本来カロチノイド合成遺伝子群を有している微生物や予めカロチノイド合成遺伝子群を導入した微生物に、本発明のDNAを導入することにより、該微生物にケトカロチノイドを生産させることもできる。以下に、各種ケトカロチノイドの微生物による生産法について説明する。

#### <カンタキサンチン、エキネノンの生産>

$\beta$ -カロチン合成に必要な *Erwinia uredovora* の crtE、crtB、crtI、crtY 遺伝子およびケト基導入酵素遺伝子である *Haematococcus* の bkt 遺伝子が大腸菌等の微生物に導入し発現させることにより、最終産物としてカンタキサンチンを生産させることができる。また、bkt 遺伝子の発現レベルの調節等により合成中間体のエキネノンも得ることができる。例えば、大腸菌を用いてカンタキサンチン、エキネノンを生産するためには、*Erwinia uredovora* の crtE、crtB、crtI、crtY 遺伝子を含む断片を大腸菌ベクター（例えば、pACYC184）に挿入したプラスミド（例えば、pACCAR16 $\Delta$ crtX）、および、*Haematococcus* の bkt 遺伝子を含む断片を大腸菌ベクター（例えば、pBluescript II KS+）に挿入したプラスミド（例えば、pHP51（第10図参照））の両プラスミドを大腸菌（例えば、JM101）に導入し、それを、例えば、アンピシリンとクロラムフェニコールを含むLB培地または2YT培地等の培地で30～37℃の培養条件で定常期まで培養し、菌体を集め、アセトン等の有機溶媒を用いてカロチノイド色素を抽出すればよい。このようにして得られるカロチノイド色素には、カンタキサンチンおよびエキネノンが含まれる。

#### <アスタキサンチン、4-ケトゼアキサンチンの生産>

ゼアキサンチン合成に必要な *Erwinia uredovora* の crtE、crtB、crtI、crtY、crtZ 遺伝子およびケト基導入酵素遺伝子である *Haematococcus* の bkt 遺伝子が大腸菌等の微生物に導入し発現させることにより、最終産物として、アスタキサンチンを生産させることができる。また、bkt 遺伝子の発現レベルの調節等により合成中間体の4-ケトゼアキサンチンも得ることができる。例えば、大腸菌を用いてアスタキサンチン、4-ケトゼアキサンチンを生産するためには、*Erwinia uredovora* の crtE、crtB、crtI、crtY、crtZ 遺伝子を含む断片を大腸菌ベク

ー (例えば、pACYC184) に挿入したプラスミド (例えば、pACCAR25 $\Delta$ crtX)、および、*Haematococcus* の bkt 遺伝子を含む断片を大腸菌ベクター (例えば、pBlue script II KS+) に挿入したプラスミド (例えば、pHP51) の両プラスミドを大腸菌 (例えば、JM101) に導入し、それを、例えば、アンピシリンとクロラムフェニコールを含む LB 培地または 2 YT 培地等の培地で 30 ~ 37 °C の培養条件下で定常期まで培養し、菌体を集め、アセトン等の有機溶媒を用いてカロチノイド色素を抽出すればよい。このようにして得られるカロチノイド色素には、アスタキサンチンおよび 4-ケトゼアキサンチンが含まれる。

<3'-ヒドロキシエキネノン、3-ヒドロキシエキネノン、フェニコキサンチンの生産>

ゼアキサンチン合成に必要な *Erwinia uredovora* の crtE、crtB、crtI、crtY、crtZ 遺伝子およびケト基導入酵素遺伝子である *Haematococcus* の bkt 遺伝子を実験菌等の微生物に導入し発現させることにより、主要産物として、アスタキサンチン、4-ケトゼアキサンチンを生産させることができるが、マイナー中間代謝産物として、3'-ヒドロキシエキネノン、3-ヒドロキシエキネノン及びフェニコキサンチンが存在するはずである。

これらの色素の生産方法は、上記の方法に準じるが、詳細は実施例を参照されたい。

## 7. 微生物の寄託

本発明の DNA である単離された bkt 遺伝子を組み込んだプラスミド pHP51 を導入した大腸菌 DH5 $\alpha$  は、工業技術院生命工学工業技術研究所に下記の通りに寄託されている。

寄託者が付した識別のための表示 : DH5 $\alpha$  (pHP51)

寄託番号 : FERM BP-4757

受託年月日 : 平成 6 年 7 月 26 日

## 図面の簡単な説明

第 1 図は、緑藻 *Haematococcus pluvialis* NIES-144 のケト基導入酵素遺伝子 (bkt) の塩基配列とコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

第2図は、緑藻 *Haematococcus pluvialis* NIES-144 のケト基導入酵素遺伝子 (bkt) の塩基配列とコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

第3図は、緑藻 *Haematococcus pluvialis* NIES-144 のケト基導入酵素遺伝子 (bkt) の塩基配列とコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

上記の第1～3図においては、開始コドンが異なっている。

第4図は、緑藻 *Haematococcus pluvialis* NIES-144 のケト基導入酵素遺伝子 (bkt) を含むDNA鎖の塩基配列を示す。図中、A、BおよびCは開始コドンの位置を示す。

第5図は、第4図に続く配列を示す。

第6図は、 $\beta$ -カロチンまでのカロチノイド生合成経路を示す。

第7図は、非光合成細菌 *Erwinia uredovora* のカロチノイド生合成経路とカロチノイド合成遺伝子の機能を示す。

第8図は、緑藻 *Haematococcus pluvialis* NIES-144 のケト基導入酵素遺伝子 (bkt) と非光合成細菌 *Erwinia uredovora* の水酸基導入酵素遺伝子 (crtZ) の機能とケトカロチノイドの主要生合成経路を示す。

第9図は、緑藻 *Haematococcus pluvialis* NIES-144 のケト基導入酵素遺伝子 (bkt) と非光合成細菌 *Erwinia uredovora* の水酸基導入酵素遺伝子 (crtZ) の機能とケトカロチノイドのマイナーな生合成経路を示す。

第10図は、緑藻 *Haematococcus pluvialis* NIES-144 のケト基導入酵素遺伝子 (bkt) を含む2種のプラスミドpHP5およびpHP51を示す。

pHP5はpSPORT 1に、pHP51はpBluescript II KS+に、lacのプロモーターのリードスルーを受ける方向に挿入されている。制限酵素切断部位は次のように省略されて示されている。S, Sall; Ss, SstI; P, PstI; Sp, SphI; N, NotI; X, XbaI; K, KpnI; Sa, SacI。

第11図は、緑藻 *Haematococcus pluvialis* NIES-144 のケト基導入酵素遺伝子 (bkt) の開始コドンを含む領域の塩基配列と各種デレションプラスミドの開始部位を示す。

第12図は、緑藻 *Haematococcus pluvialis* NIES-144 のbkt遺伝子の1.7kb DNA断片をプローブとした、3種類の *Haematococcus* に対するサザン分析 (電

泳動写真)を示す。

レーン1～3 : *Haematococcus pluvialis* NIES-144

レーン4～6 : *Haematococcus lacustris* UTEX294

レーン7～9 : *Haematococcus lacustris* C-392

レーン1、4、7 : HindIII消化物

レーン2、5、8 : PstI 消化物

レーン3、6、9 : XbaI 消化物

#### 発明を実施するための最良の方法

以下、本発明を実施例により具体的に説明する。本発明の範囲はこれらの実施例により限定されるものではない。

#### [実施例1] 生物材料と培地組成

遺伝子取得に用いた*Haematococcus pluvialis*は、財団法人 地球・人間環境フォーラム (Global Environmental Forum)に登録されている NIES-144 株である。*Haematococcus pluvialis*を基本培地(酵母エキス 0.2%、酢酸ナトリウム 0.12%、L-アスパラギン 0.04%、塩化マグネシウム・六水和物 0.02%、硫酸第一鉄・七水和物 0.001%、塩化カルシウム・二水和物 0.002%)を用い、20℃、12時間明/12時間暗(20  $\mu$ E/m<sup>2</sup>・s)で約4日間培養した。又、*Haematococcus pluvialis*のアスタキサンチン合成を誘導する為に、*Haematococcus pluvialis* NIES-144 株に酢酸を最終濃度45mM、硫酸第一鉄・七水和物を最終濃度450  $\mu$ Mになるように加え、20℃、光強度 125  $\mu$ E/m<sup>2</sup>・sで約12時間培養して、シスト化を誘導した。

#### [実施例2] *Haematococcus pluvialis*の全DNAの調製

*Haematococcus pluvialis* NIES-144 株を400mlの基本培地に植菌して20℃、光強度20  $\mu$ E/m<sup>2</sup>・s、明暗サイクル12時間明/12時間暗で約4日間培養した。培養液から菌体を集菌し、液化窒素で凍結して、乳鉢で菌体が粉末状になるまで破碎した。粉末状の破碎菌体に15mlの抽出緩衝液(0.1 M Tris-HCl pH8.0, 0.1 M EDTA,



0.25 M NaCl, 0.1 mg/ml Proteinase K )を加えて激しく攪拌し、55℃で2時間保温した後、6000x g、10分間、4℃で遠心して沈殿物を取り除いた。上清に0.6倍量のイソプロパノールを加え、-20℃で30分間冷却した後、7500x g、15分間、4℃で遠心した。沈殿したDNA含有物を2mlのTE緩衝液(10mM トリス-HCl pH8.0, 1 mM EDTA)で溶解し、等量のフェノール：クロロホルム(1:1)と混合して遠心し、上層を抽出した。続いて80 $\mu$ lの5M NaClと5mlのエタノールを加えて-20℃で30分間冷却した後、12000x g、15分間、4℃で遠心した。更に70%エタノールで沈殿物をリンスした後、乾燥して0.5 mlのTE緩衝液(10 mM Tris-HCl pH8.0, 1 mM EDTA)に溶解し、2.5 $\mu$ lの10 mg/mlのRNase Aを加えたものを*Haematococcus pluvialis*の全DNA溶液とした。

[実施例 3] PCRによる*Haematococcus pluvialis* からのcrtZ相同領域の単離の試み

*Erwinia uredovora*と*Erwinia herbicola*のcrtZ遺伝子 (Misawa, N., Nakagawa, M., Kobayashi, K., Yamano, S., Izawa, Y., Nakamura, K., Harashima, K., "Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli*.", J. Bacteriol., 172, p.6704-6712, 1990、Hundle, B.S., Beyer, P., Kleinig, H., Englert, G., Hearst, J.E., "Carotenoids of *Erwinia herbicola* and an *Escherichia coli* HB101 strain carrying the *Erwinia herbicola* carotenoid gene cluster.", Phytochem. Phytobiol., 54, p.89-93, 1991) にコードされるアミノ酸配列を比較することから相同性の高い領域を見つけだし、その領域のアミノ酸配列から予想される使用コドン을組合わせて、以下の混合プライマーを3種類合成した。

No. 1 5'-GGNTGGGGNTGGCAYAARTCNCA YCA-3'

No. 2 5'-CANCGYTGR TGNACNAGNCCRT CRTG-3'

No. 3 5'-GCRTASATRAANCCRAARCTNACRCA-3'

(N: A, G, CまたはT, R: AまたはG, Y: CまたはT, S: A, G または T)

No. 1とNo. 2及びNo. 1とNo. 3の混合プライマーを使って*Haematococcus pluvialis*

s の全DNA溶液を鋳型としてPCR (polymerase chain reaction) を行った。最終濃度がそれぞれ、約100 ngのHaematococcus pluvialis の全DNA溶液、各100  $\mu$ Mの混合プライマー、10 mM  $\text{MgSO}_4$ 、1xVent Buffer(10 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH8.8), 10 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.1 % Triton X-100), 250  $\mu$ M dNTP、2 U Vent DNA polymerase (New England Biolabs, Inc.) になるように混合し、94°C 30秒間、55°C 30秒間、72°C 30秒間で30サイクル、及び94°C 30秒間、60°C 30秒間、72°C 30秒間で30サイクルの反応条件でPCRを行い、電気泳動法で反応生成物の有無を確認した。しかし、いずれの場合も、明確な単一の生成物を検出することは出来なかった。

#### [実施例4] Haematococcus pluvialisの全RNAの調製

Haematococcus pluvialis NIES-144 株を800 mlの基本培地に植菌して20°C、光強度20  $\mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ 、明暗サイクル12時間明/12時間暗で約4日間培養し、続いて酢酸を最終濃度45mM、硫酸第一鉄・七水和物を最終濃度450  $\mu\text{M}$ になるように加え、20°C、光強度125  $\mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ で約12時間培養した。培養液から菌体を集菌し、液化窒素で凍結して、乳鉢で菌体が粉末状になるまで破碎した。粉末状の破碎菌体に3 mlのISOGEN-LS ((株)ニッポンジーン)を加え、室温で5分間放置し、更に0.8 mlのクロロホルムを加えた後、15秒間激しく攪拌して3分間、室温で放置した。12000x g、15分間、4°Cで遠心して上層を抽出し、2 mlのイソプロパノールを加えて10分間、室温で放置後、12000x g、10分間、4°Cで遠心した。続いて70%エタノールで沈殿物をリンスした後、乾燥して1mlのTE緩衝液(10mM トリス-HCl (pH8.0), 1 mM EDTA)に溶解したものをHaematococcus pluvialisの全RNA溶液とした。この調製法で4.1 mgの全RNAが得られた。

#### [実施例5] Haematococcus pluvialisのcDNA発現ライブラリーの作製

オリゴテックス-dT30スーパー (宝酒造 (株)) を用いてHaematococcus pluvialisの全RNA約1mgからポリA+RNAを精製した。精製方法は、添付の製品説明書の使用方法に従った。この精製方法で約14  $\mu\text{g}$ のポリA+mRNAを精製した。cDNAの作製は、スーパースクリプトTMプラスミドシステム (GIBCO BRL社) を用

い、添付の説明書の使用方法を一部改変して以下の通りに行った。約5 $\mu$ gのポリA+RNAを用い、制限酵素NotIの認識配列と15mersのオリゴdTからなる合成DNAをプライマーとして逆転写酵素SUPERSCRIPRTで相補鎖DNAを合成し、続いてE. coli DNA リガーゼ、E. coli DNA ポリメラーゼ、E. coli DNA RNase Hを用いて2本鎖cDNAを合成した後、制限酵素SalIのリンカーをT4 DNA リガーゼで結合させ、最終的にcDNAの上流末端がSalI部位、ポリAの下流がNotI部位になるようにした。電気泳動法を用いて、これらcDNAのサイズ分画を行い、0.7kb~3.5kbの範囲の分画を集めた。この分画のcDNA約28 ngと35ngのcDNA発現ベクターpSPORT I (GIBCO BRL 社) を NotI とSalIで消化したものとを上キットに含まれているライゲーションバッファー(50mM トリス-HCl pH 7.6, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM ATP, 1mM DTT, 5% PEG 8000)及びT4 DNA リガーゼを用いてライゲーションした。このcDNA発現ベクターpSPORT Iは、SalI部位の上流にlacプロモーターをもち、大腸菌内でcDNAを発現させることができるベクターである。次にライゲーションしたDNA溶液を全て使って、Molecular Cloning 2nd edition : Cold Spring Harbor Laboratory, 1.21-1.41 (1989)の方法に従って調製した大腸菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  のコンピテントセルの形質転換を行った。約4万個の形質転換株が得られ、これらを全て集めた後、Molecular Cloning 2nd edition : Cold Spring Harbor Laboratory, 1.21-1.41 (1989)の方法に従い、プラスミドDNAを調製した。その結果、0.6 mgのプラスミドDNAが得られ、これをHaematococcus pluvialisのcDNA発現ライブラリーとした。

[実施例6] ケト基導入酵素遺伝子を保持した大腸菌の色調変化を利用したスクリーニング

(1)  $\beta$ -カロチン産生大腸菌の作製

*Erwinia uredovora*のcrtZ以外のカロチノイド合成遺伝子群(crtX, crtE, crtY, crtI, crtB遺伝子)を有するプラスミドpCAR16 (Misawa, N. Nakagawa, M. Kobayashi, K. Yamano, S. Izawa, Y. Nakamura, K. Harashima, K., "Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli*." J. Bacteriol., 172, p.

6704-6712, 1990、及び特開平3-58786号公報参照)のBstEII消化、Klenow酵素処理、リガーゼ反応を行うことにより、crtX遺伝子をフレームシフトにより失活させた後、 $\beta$ -カロチン産生に必要なcrtE, crtY, crtI, crtB遺伝子を含む6.0kbのAsp718(KpnI)-EcoRI断片を切り出した。この断片を大腸菌ベクターpACYC184(ATCC 37033より入手)のEcoRV部位に挿入し、目的とするプラスミド(pACCAR16 $\Delta$ crtXと命名)を得た。このpACCAR16 $\Delta$ crtXを有する大腸菌は、クロラムフェニコール耐性を示し、 $\beta$ -カロチンを生産することができる。

## (2) ケト基導入酵素遺伝子のスクリーニング

ケトカロチノイドは、*Haematococcus pluvialis*内では $\beta$ -カロチンを経て生合成され则认为られる(Britton, G., "Biosynthesis of carotenoids". Plant Pigments. London, Academic Press, 1988, p. 133-182. (Goodwin, T. W. ed.) 参照)。そこで上記のpACCAR16 $\Delta$ crtXを保持する大腸菌JM101が $\beta$ -カロチン(黄色)を産生することを利用して、この大腸菌に上記のcDNA発現ライブラリーを導入し、得られた形質転換体の色調変化から、ケト基導入酵素遺伝子を保持した大腸菌をスクリーニングした。ケト基が導入され、ケトカロチノイドのひとつであるカンタキサンチンが合成されると大腸菌の色調が $\beta$ -カロチンの黄色からカンタキサンチンの赤色に変わると予想された。

まず、Molecular Cloning 2nd edition : Cold Spring Harbor Laboratory, 1.21-1.41 (1989)の方法を用い、pACCAR16 $\Delta$ crtXを保持する大腸菌JM101のコンピテントセルを作製した。

次に、このコンピテントセル1 mlに対して100 ngのcDNA発現ライブラリーを導入し、約4万個の形質転換体に対してスクリーニングを行い、他の株と色調がやや異なる赤みがあった株を1株単離した。(この株の色素は、実施例7においてカンタキサンチンと同定)なお、この株が保持しているcDNA発現プラスミドをpHP5と命名した。プラスミドpHP5の構成を第10図に示す。

## [実施例7] ケト基導入酵素遺伝子の塩基配列決定

pHP5に挿入されている*Haematococcus pluvialis*由来の1.7 kb cDNAを制限酵素SalIとXbaIで切り出し、大腸菌ベクターpBluescript II KS+およびpBluescrip

t II SK+のSalI/XbaI部位に挿入して、2種のプラスミド（pHP51およびpHP52と命名）を得た。このうちプラスミドpHP51の制限酵素地図を第10図に示す。pHP51及びpHP52は、それぞれ、上記cDNAがlacのプロモーターのリードスルーを受ける方向及び受けない方向に挿入されてたものである。

作製したプラスミドpHP51、pHP52について以下の手順で種々の長さの欠失を有する欠失変異体作製を行い、それらについて塩基配列の決定を行った。pHP51はSacIとXbaIとで分解し、pHP52はKpnIとSalIとで分解した後、フェノール/クロロホルム抽出を行い、エタノール沈殿によりDNAを回収した。それぞれのDNAを100  $\mu$ lのExoIIIバッファー（50mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM 2-メルカプトエタノール、pH8.0）に溶解し、180ユニットのExoIIIヌクレアーゼを加えて37℃で保温した。30秒ごとに10  $\mu$ lの反応溶液をサンプリングして、10  $\mu$ lのMBバッファー（40mM NaCl, 2mM ZnCl<sub>2</sub>, 10%グリセロール、pH4.5）の入った氷上のチューブに移した。サンプリング終了後、得られた10本のチューブを65℃、10分間保温して酵素を失活させた後、5ユニットのマンガビーンヌクレアーゼを加えて37℃で30分保温した。反応後、アガロースゲル電気泳動により、1つのプラスミドのついて10種のそれぞれ欠失の程度が異なるDNA断片を回収した。回収したDNAはKlenow 酵素により末端を平滑化し、16℃、一晚ライゲーション反応した後、大腸菌DH5 $\alpha$ を形質転換した。得られた種々のクローンについてプラスミドを調製し、アプライドバイオシステム（株）の蛍光プライマーサイクルシーケンスキットを用いてシーケンス反応を行い、自動シーケンサーを用いて塩基配列を決定した。

決定した1677塩基対（bp）からなる配列を第4図および第5図（配列番号4）に示す。オープンリーディング・フレーム検索の結果、大腸菌内で発現するのに必要なリボソーム結合部位を開始コドンの上流に持つ3つのオープンリーディングフレーム（第1図のA～D（配列表の配列番号5に示す）、第2図のB～D（配列表の配列番号6に示す）、第3図のC～D（配列表の配列番号7に示す））が見いだされた。なお、実施例8で示すように、Cより短くすると大腸菌内での酵素活性が無くなるので、これより下流には、開始コドンは存在しないと考えられることから、第3図のCより下流の領域については上記のオープンリー



ディングフレームの検索からは省略した。

〔実施例 8〕 ケト基導入酵素遺伝子の開始コドンの決定

第11図に上記オープンリーディングフレームの上流部分の塩基配列を示す。開始コドンの可能性がある部位は、5ヶ所（塩基位置168～170、189～191、264～266、348～350、423～425、これらの位置は第11図において枠で囲われている。）存在する。第11図に示す開始コドンにおける168 位の塩基、189 位の塩基、および264 位の塩基は、それぞれ、第1図のA、第2図のB、および第3図のCで示した位置に相当する。そこで機能タンパク質として必要な最小領域を決定するために、実施例5と同様の方法によりpHP51の欠失変異体作成を行い、上流領域が欠失したプラスミドを数種作製した。第11図には、それぞれの欠失プラスミドの番号と上流末端位置を示す。これらプラスミドを実施例6に記したpACCAR16 $\Delta$ crtXを保持する大腸菌JM101にそれぞれ導入し、その産生色素を同定した結果、番号30、27、31、37、12の欠失プラスミドを保持する大腸菌では、カンタキサンチンの産生が認められたが、番号10、6、38では認められなかった。また、番号12の場合、塩基位置264～266の開始コドンATGのAまでが欠失しているが、欠失変異体を作成した際にこのATGがGTGとなり、大腸菌はGTGでも開始コドンと認識することから、この位置の開始コドンからペプチド合成が始まっていると考えられる。したがって264～266の開始コドン以下のオープンリーディングフレーム（第3図のC～D（配列表の配列番号7に示す。））からコードされるポリペプチド鎖であれば十分ケト基導入酵素活性を示すことが明らかになった。

〔実施例 9〕 ケトカロチノイド色素の同定

（1）カンタキサンチンの同定

pHP5またはpHP51を $\beta$ -カロチン産生大腸菌JM101に導入したもの（大腸菌（pACCAR16 $\Delta$ crtX、pHP5またはpHP51））（橙色を呈している）を 150  $\mu$ g/mlのアンピシリン（Ap、明治製菓製）、30  $\mu$ g/mlのクロラムフェニコール（Cm、三共製）、1 mMのIPTG、7 mg FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>Oおよび9.3 mg Na<sub>2</sub>・EDTAを含む2YT培地（1.6%トリプトン、1%イーストエキス、0.5% NaCl）2リットルで、30℃、24

～30時間培養した。培養液から集菌した菌体を、300 ml のアセトンにより抽出した。これを濃縮後、200 ml のクロロホルム／メタノール (9/1) で2回抽出し、濃縮乾固した。さらに、これを少量のクロロホルム／メタノール (9/1) に溶解後、メルク社製の分取用シリカゲルTLCプレートを用いて、クロロホルム／メタノール (50/1) で展開することにより、薄層クロマトグラフィー (TLC) を行った。このTLCにより、スポットはRf値0.53、0.78および1の3スポットに分かれた。抽出された色素全体の75%に相当する最も濃い赤色色素(Rf 値0.53)を、TLCプレートからかきとった。この赤色色素をさらに少量のクロロホルム／メタノール (9/1) に溶解後、セファデクスLH-20カラムクロマトグラフィー (15 X 300 mm) にかき、クロロホルム／メタノール (9/1) で展開溶出することにより、純品を2 mg得た。本物質の紫外－可視スペクトル、<sup>1</sup>H-NMR、FD-MSスペクトル (m/e 564)、および、シリカゲルTLCの移動度 (クロロホルム／メタノール (50/1) で展開でRf値0.53) が、カンタキサンチンの標準品 (BASF社製) とすべて一致したため、本物質をカンタキサンチン (構造式は第8図参照) と同定した。

また、最初に抽出された色素の10%に相当する赤色色素 (TLC でRf値0.78) を、TLC プレートからかきとり、少量のメタノールに溶かした。この色素の紫外－可視スペクトル、シリカゲルTLCの移動度 (クロロホルム／メタノール (50/1) で展開でRf値0.78)、および、ノバパックHR6 $\mu$ C<sub>18</sub> (3.9 X 300 mm) (ウォーターズ社製) を用いたHPLCの移動度 (アセトニトリル/ メタノール/2- プロパノール (90/6/4)で1.0 ml/ 分の速度での展開でRT16分) よりエキネノン (構造式は第8図参照) であると考えられた。

次いで、最初に抽出された色素の残り15%に相当する黄色色素 (TLC でRf値1)をTLC プレートからかきとり、少量のメタノールに溶かした。この色素の紫外－可視スペクトル、および、ノバパックHR 6 $\mu$  C<sub>18</sub> (3.9 X 300 mm) (ウォーターズ社製) を用いたHPLCの移動度 (アセトニトリル／メタノール／2-プロパノール (90/6/4)で1.0 ml/ 分の速度での展開でRT62分) が、 $\beta$ -カロチンの標準品 (オールトランス型、Sigma 社製) とすべて一致したため、本物質は未反応の $\beta$ -カロチン (構造式は第8図参照) であることがわかった。

(2) アスタキサンチン、4-ケトゼアキサンチンの同定

ゼアキサンチン産生大腸菌を次のようにして作製した。すなわち、*Er. uredovora* の全カロチノイド合成遺伝子群を有するプラスミド pCAR25 (Misawa, N., Nakagawa, M., Kobayashi, K., Yamano, S., Izawa, Y., Nakamura, K., Harashima K., "Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli*". J. Bacteriol., 172, p.6704-6712, 1990および特開平3-58786号)の制限酵素 BstEII 消化、Klenow fragment 処理、ライゲーション反応を行うことにより、*crtX* 遺伝子をフレームシフトにより失活させた後、ゼアキサンチン産生に必要な *crtE*、*crtB*、*crtI*、*crtY*、*crtZ* 遺伝子を含む 6.5 kb *Asp718* (*KpnI*) - *EcoRI* 断片を切りだした。そして、この断片を大腸菌ベクター pACYC184 の *EcoRV* 部位に挿入し、目的とするプラスミド (pACCAR25Δ*crtX*と命名) を得た。

pHP5またはpHP51をこのゼアキサンチン産生大腸菌 JM101 に導入したもの (大腸菌 (pACCAR25Δ*crtX*、pHP5またはpHP51)) (橙色を呈している) を 150 μg/ml Ap、30 μg/ml の Cm、1 mM の IPTG、7 mg FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O および 9.3 mg Na<sub>4</sub> · EDTA を含む 2YT 培地 (1.6% トリプトン、1% イーストエキス、0.5% NaCl) 2 リットルで、30℃、24~30 時間培養した。培養液から集菌した菌体を、300 ml のアセトンにより抽出した。これを濃縮後、200 ml のクロロホルム/メタノール (9/1) で 2 回抽出し、濃縮乾固した。さらに、これを少量のクロロホルム/メタノール (9/1) に溶解後、メルク社製の分取用シリカゲル TLC プレートを用いて、クロロホルム/メタノール (15/1) で展開することにより、薄層クロマトグラフィー (TLC) を行った。元の橙色色素は、この TLC により、主要スポットは、R<sub>f</sub> 値 0.40、0.54、0.72 の 3 スポットに分かれた。これらの色素を、TLC プレートから、かきとった後、少量のクロロホルム/メタノール (9/1) に溶解し、セファデクス LH-20 カラムクロマトグラフィー (15 X 300 mm) にかけて、クロロホルム/メタノール (9/1) で展開溶出することにより、各々の純品を、それぞれ、約 1 mg、1 mg、2 mg 得た。

抽出された色素全体の約半分に相当する R<sub>f</sub> 0.72 の色素は、紫外-可視スペクトル、<sup>1</sup>H-NMR、FD-MS スペクトル (*m/e* 596) の結果より、アスタキサンチンと同一の平面構造を持つものであることが明かになった。そこで、ジエチルエーテ

ル：2-プロパノール：エタノール 5：5：2 に溶解し、CDスペクトルを測定したところ、3S, 3'Sの立体構造をとることがわかったため、本物質をアスタキサンチン（構造式は第8図参照）と同定した。また、Rf 0.54の色素は、その紫外-可視スペクトル、<sup>1</sup>H-NMR、FD-MSスペクトル (*m/e* 582)、および、シリカゲルTLCの移動度（クロロホルム/メタノール (15/1)）での展開でRf値0.54）から、4-ケトゼアキサンチン（構造式は第8図参照）と同定された。なお、Rf 0.40の色素は、紫外-可視スペクトル、シリカゲルTLCの移動度（クロロホルム/メタノール (15/1)）で展開でのRf値0.40）、および、ノバパックHR6 $\mu$ C<sub>18</sub> (3.9 × 300 mm)（ウォータース社製）を用いたHPLCの移動度（アセトニトリル/メタノール/2-プロパノール(90/6/4)で1.0 ml/分の速度での展開でRT6.5分）がゼアキサンチンの標準品（BASF社製）とすべて一致したため、本物質は未反応のゼアキサンチン（構造式は第8図参照）であることがわかった。

以上のことから、ケト基導入酵素遺伝子の機能について以下のように考えることができる。

実施例9 (1) より、Haematococcusのケト基導入酵素遺伝子 (bkt) は、 $\beta$ -カロチンを基質として、エキネノンを経てカンタキサンチンへの変換を触媒するケト基導入酵素 ( $\beta$ -carotene ketolase) をコードしていることは明かである（第8図参照）。このことは1つの酵素BKTが $\beta$ -イオノン環の4位及び4'位のメチレン基をいきなりケト基に変換してしまうことを示している。このような機能を持つ酵素は今まで知られていなかったものである。さらに、実施例9 (2) より、Haematococcusのbkt遺伝子は、上記の活性以外に、ゼアキサンチンを基質として、4-ケトゼアキサンチンを経てアスタキサンチンへの変換を触媒するケト基導入酵素 (zeaxanthin ketolase) をコードしていることは明かである（第8図参照）。このことは1つの酵素BKTが3-及び3'-ヒドロキシ- $\beta$ -イオノン環の4位および4'位のメチレン基をいきなりケト基に変換してしまうことを示している。このような機能を持つ酵素も今まで知られていなかったものである。したがって、Haematococcusのケト基導入酵素遺伝子bkt は、3位 (3'位) の位置に水酸基が付加しているしていないにかかわらず、4位 (4'位) のメチレン基をいきなりケト基に変換する $\beta$ -イオノンまたは3-ヒドロキシ- $\beta$ -イオノン環

ケト基導入酵素 ( $\beta$ -ionone or 3-hydroxy- $\beta$ -ionone ring ketolase) をコードしているということができる。なお、 $\beta$ -イオノン環や3-ヒドロキシ- $\beta$ -イオノン環に限らず、1つの酵素がメチレン基をいきなりケト基に変換するという知見は今まで存在しなかったものである。

一方、植物常在細菌 *Erwinia* や光合成細菌 *Rhodobacter* のカロチノイド合成遺伝子を用いた我々の研究により、一般に、カロチノイド生合成酵素は、基質となるカロチノイド分子の半分を認識して作用することが明かになってきた。たとえば、*Erwinia* のリコピン環化酵素遺伝子である *crtY* はリコピン分子の半分ずつを認識して環化する。したがって、*Rhodobacter* のフィトエンデサチュラーゼ遺伝子 *crtI* を用いることによりリコピンの変わりにノイロスポレンを大腸菌に合成させ、これに *Erwinia* の *crtY* を作用させると、ノイロスポレンにおけるリコピンと共通な半分の分子構造だけを *crtY* 遺伝子産物は認識し、半分だけ環化した  $\beta$ -ゼアカロチンを産生する (Linden, H., Misawa, N., Chamovitz, D., Pecker, I., Hirschberg, J., Sandmann, G., "Functional complementation in *Escherichia coli* of different phytoene desaturase genes and analysis of accumulated carotenes", *Z. Naturforsch.*, 46c, p.1045-1051, 1991)。また、本発明においても、 $\beta$ -カロチンに BKT を作用させると、まず1つケト基が導入されたエキネノンが合成されるし、ゼアキサントシンに BKT を作用させると、まず1つケト基が導入された4-ケトゼアキサントシンが合成される。これは、BKT が基質の半分の分子を認識して4位の位置にケト基を導入するからと考えることができる。一方、*Erwinia* の *crtE*、*crtB*、*crtI*、*crtY*、*crtZ* 遺伝子を有する大腸菌は、前述したように、ゼアキサントシンを産生するが、その中間代謝産物として、 $\beta$ -カロチンに1つ水酸基が導入された  $\beta$ -クリプトキサントシンを検出することができる。このことは、そこに BKT が存在すると、 $\beta$ -クリプトキサントシンを基質として3'-ヒドロキシエキネノンや3-ヒドロキシエキネンを合成することができ、さらに、これらに BKT が作用してフェニコキサントシンを合成できると考えることができる。今回、我々は、培養物中にこれらのケトカロチノイドを同定するには至っていないが、その理由は、今回行われた条件では、これらが微量しか存在しないためであると思われる。事実、*Haematococcus* と並んで代表的アスタキサン



チン産生微生物である *Phaffia rhodozyma* においては、アスタキサンチン中間代謝産物として3-ヒドロキシエキネノンやフェニコキサンチンが検出されている (Andrewes, A. G., Phaff, H. J., Starr, M. P., "Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red-pigmented fermenting yeast". *Phytochemistry*, 15, p.1003-1007, 1976)。以上のことより、第8図に示したアスタキサンチンの主要代謝経路の他に、第9図に示したマイナーな代謝経路も存在すると考えることができる。

〔実施例10〕 他の緑藻 *Haematococcus* の染色体DNAに対するサザン分析

他の緑藻 *Haematococcus* の染色体上に単離した *bkt* と相同性を示す領域が得られるか否かを検討した。実施例2に記した *Haematococcus pluvialis* NIES-144からの全DNAの調製法と同じ方法で *Haematococcus lacustris* UTEX 294と *Haematococcus lacustris* C-392 の全DNAを調製し、*Haematococcus pluvialis* NIES-144の全DNAと共に制限酵素 *Hind*III、*Pst*Iあるいは *Xba*Iで消化してアガロースゲル電気泳動法で分離した。分離したDNA断片を0.5N NaOH、1.5M NaClのアルカリ溶液で変性した後、一晩かけてナイロンメンブレンにトランスファーさせた。DNAが吸着したナイロンメンブレンをハイブリダイゼーション溶液 (6×Denhardt、5×SSC、0.2% SDS、100 μg/ml ssDNA) に浸し、4時間、55℃でプレハイブリダイゼーションを行った。次に *bkt* 遺伝子の1.7kb DNA断片を Megaprime™ DNA labelling systems (アマシャム) と [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP (～110 TBq/mmol) とを用いて標識化し、上記のプレハイブリダイゼーション溶液に加えて16時間、55℃でハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後、2×SSC、0.1% SDSで60℃、1時間洗浄し、オートラジオグラフィーによって相同性を示すシグナルを検出した結果、*Haematococcus pluvialis* NIES-144では、*Hind*III消化物で15kb、10kb、1.9kb、*Pst*I消化物では6.1kb、3.3kb、2.8kb、2.3kb、2.0kb、1.4kb、0.8kb、*Xba*I消化物で5.1kbの位置にそれぞれ強いシグナルが得られた。これに対して、*Haematococcus lacustris* UTEX 294では、*Hind*III消化物で15kb、7.7kb、1.9kb、*Pst*I消化物で10kb、5.0kb、4.0kb、3.4kb、2.9kb、1.5kb、0.82kb、*Xba*I消化物では20kb以上のDNAの位置だけに

それぞれ強いシグナルが得られ、*Haematococcus lacustris* C-392 では、HindIII 消化物で15kb、12kb、1.9kb、PstI消化物では6.5 kb、3.0kb、2.3kb、2.0kb、1.4kb、0.8kb、XbaI消化物では5.3 kbの位置にそれぞれ強いシグナルが得られた（第12図）。

#### 産業上の利用可能性

$\beta$ -イオノン環の4位のメチレン基をケト基に転換する酵素をコードする本発明のDNAを外来遺伝子として大腸菌等の微生物に導入し、発現させることにより、大腸菌等の微生物にアスタキサンチン、4-ケトゼアキサンチン、カンタキサンチン、エキネノン、その他のケト基を含むケトカロチノイドの生合成能を付与することが可能となった。ケト基を含むケトカロチノイドの生合成能を付与された大腸菌等の微生物を用いることにより、ケト基を含むケトカロチノイドを少ない労力およびコストで大量に製造することができる。

WO 96/06172

## 配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 3 2 0

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

## 起源

生物名 : *Haematococcus pluvialis*

株名 : NIES-144

## 配列

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | His | Val | Ala | Ser | Ala | Leu | Met | Val | Glu | Gln | Lys | Gly | Ser | Glu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |
| Ala | Ala | Ala | Ser | Ser | Pro | Asp | Val | Leu | Arg | Ala | Trp | Ala | Thr | Gln |
|     |     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |
| Tyr | His | Met | Pro | Ser | Glu | Ser | Ser | Asp | Ala | Ala | Arg | Pro | Ala | Leu |
|     |     |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |
| Lys | His | Ala | Tyr | Lys | Pro | Pro | Ala | Ser | Asp | Ala | Lys | Gly | Ile | Thr |
|     |     |     |     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |
| Met | Ala | Leu | Thr | Ile | Ile | Gly | Thr | Trp | Thr | Ala | Val | Phe | Leu | His |
|     |     |     |     | 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |
| Ala | Ile | Phe | Gln | Ile | Arg | Leu | Pro | Thr | Ser | Met | Asp | Gln | Leu | His |
|     |     |     |     | 80  |     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |
| Trp | Leu | Pro | Val | Ser | Glu | Ala | Thr | Ala | Gln | Leu | Leu | Gly | Gly | Ser |
|     |     |     |     | 95  |     |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |
| Ser | Ser | Leu | Leu | His | Ile | Ala | Ala | Val | Phe | Ile | Val | Leu | Glu | Phe |
|     |     |     |     | 110 |     |     |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |
| Leu | Tyr | Thr | Gly | Leu | Phe | Ile | Thr | Thr | His | Asp | Ala | Met | His | Gly |
|     |     |     |     | 125 |     |     |     |     | 130 |     |     |     |     | 135 |
| Thr | Ile | Ala | Leu | Arg | His | Arg | Gln | Leu | Asn | Asp | Leu | Leu | Gly | Asn |

|   |     |     |
|---|-----|-----|
| 140   | 145 | 150 |
| Ile Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Ser Met Leu His |     |     |
| 155   | 160 | 165 |
| Arg Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys |     |     |
| 170   | 175 | 180 |
| Asp Pro Asp Phe His Lys Gly Asn Pro Gly Leu Val Pro Trp Phe |     |     |
| 185   | 190 | 195 |
| Ala Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Leu Trp Gln Phe Ala Arg |     |     |
| 200   | 205 | 210 |
| Leu Ala Trp Trp Ala Val Val Met Gln Met Leu Gly Ala Pro Met |     |     |
| 215   | 220 | 225 |
| Ala Asn Leu Leu Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala |     |     |
| 230   | 235 | 240 |
| Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Glu |     |     |
| 245   | 250 | 255 |
| Pro Gly Pro Ala Ala Gly Ser Gln Val Met Ala Trp Phe Arg Ala |     |     |
| 260   | 265 | 270 |
| Lys Thr Ser Glu Ala Ser Asp Val Met Ser Phe Leu Thr Cys Tyr |     |     |
| 275   | 280 | 285 |
| His Phe Asp Leu His Trp Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro |     |     |
| 290   | 295 | 300 |
| Trp Trp Gln Leu Pro His Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu |     |     |
| 305   | 310 | 315 |
| Val Pro Ala Leu Ala   |     |     |
| 320   |     |     |

配列番号 : 2

配列の長さ : 3 1 3

配列の型 : アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

起源

生物名：Haematococcus pluvialis

株名：NIES-144

配列

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Val | Glu | Gln | Lys | Gly | Ser | Glu | Ala | Ala | Ala | Ser | Ser | Pro | Asp |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |
| Val | Leu | Arg | Ala | Trp | Ala | Thr | Gln | Tyr | His | Met | Pro | Ser | Glu | Ser |
|     |     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |
| Ser | Asp | Ala | Ala | Arg | Pro | Ala | Leu | Lys | His | Ala | Tyr | Lys | Pro | Pro |
|     |     |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |
| Ala | Ser | Asp | Ala | Lys | Gly | Ile | Thr | Met | Ala | Leu | Thr | Ile | Ile | Gly |
|     |     |     |     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |
| Thr | Trp | Thr | Ala | Val | Phe | Leu | His | Ala | Ile | Phe | Gln | Ile | Arg | Leu |
|     |     |     |     | 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |
| Pro | Thr | Ser | Met | Asp | Gln | Leu | His | Trp | Leu | Pro | Val | Ser | Glu | Ala |
|     |     |     |     | 80  |     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |
| Thr | Ala | Gln | Leu | Leu | Gly | Gly | Ser | Ser | Ser | Leu | Leu | His | Ile | Ala |
|     |     |     |     | 95  |     |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |
| Ala | Val | Phe | Ile | Val | Leu | Glu | Phe | Leu | Tyr | Thr | Gly | Leu | Phe | Ile |
|     |     |     |     | 110 |     |     |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |
| Thr | Thr | His | Asp | Ala | Met | His | Gly | Thr | Ile | Ala | Leu | Arg | His | Arg |
|     |     |     |     | 125 |     |     |     |     | 130 |     |     |     |     | 135 |
| Gln | Leu | Asn | Asp | Leu | Leu | Gly | Asn | Ile | Cys | Ile | Ser | Leu | Tyr | Ala |
|     |     |     |     | 140 |     |     |     |     | 145 |     |     |     |     | 150 |
| Trp | Phe | Asp | Tyr | Ser | Met | Leu | His | Arg | Lys | His | Trp | Glu | His | His |
|     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |     |     |     |     | 165 |
| Asn | His | Thr | Gly | Glu | Val | Gly | Lys | Asp | Pro | Asp | Phe | His | Lys | Gly |



|   |     |     |
|---|-----|-----|
| 170   | 175 | 180 |
| Asn Pro Gly Leu Val Pro Trp Phe Ala Ser Phe Met Ser Ser Tyr |     |     |
| 185   | 190 | 195 |
| Met Ser Leu Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala Trp Trp Ala Val Val |     |     |
| 200   | 205 | 210 |
| Met Gln Met Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn Leu Leu Val Phe Met |     |     |
| 215   | 220 | 225 |
| Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly |     |     |
| 230   | 235 | 240 |
| Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Pro Ala Ala Gly Ser |     |     |
| 245   | 250 | 255 |
| Gln Val Met Ala Trp Phe Arg Ala Lys Thr Ser Glu Ala Ser Asp |     |     |
| 260   | 265 | 270 |
| Val Met Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu |     |     |
| 275   | 280 | 285 |
| His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Gln Leu Pro His Cys |     |     |
| 290   | 295 | 300 |
| Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Leu Ala         |     |     |
| 305   | 310 | 313 |

配列番号 : 3

配列の長さ : 2 8 8

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

起源

生物名 : *Haematococcus pluvialis*

株名 : NIES-144

配列

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Pro | Ser | Glu | Ser | Ser | Asp | Ala | Ala | Arg | Pro | Ala | Leu | Lys | His |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |
| Ala | Tyr | Lys | Pro | Pro | Ala | Ser | Asp | Ala | Lys | Gly | Ile | Thr | Met | Ala |
|     |     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |
| Leu | Thr | Ile | Ile | Gly | Thr | Trp | Thr | Ala | Val | Phe | Leu | His | Ala | Ile |
|     |     |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |
| Phe | Gln | Ile | Arg | Leu | Pro | Thr | Ser | Met | Asp | Gln | Leu | His | Trp | Leu |
|     |     |     |     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |
| Pro | Val | Ser | Glu | Ala | Thr | Ala | Gln | Leu | Leu | Gly | Gly | Ser | Ser | Ser |
|     |     |     |     | 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |
| Leu | Leu | His | Ile | Ala | Ala | Val | Phe | Ile | Val | Leu | Glu | Phe | Leu | Tyr |
|     |     |     |     | 80  |     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |
| Thr | Gly | Leu | Phe | Ile | Thr | Thr | His | Asp | Ala | Met | His | Gly | Thr | Ile |
|     |     |     |     | 95  |     |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |
| Ala | Leu | Arg | His | Arg | Gln | Leu | Asn | Asp | Leu | Leu | Gly | Asn | Ile | Cys |
|     |     |     |     | 110 |     |     |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |
| Ile | Ser | Leu | Tyr | Ala | Trp | Phe | Asp | Tyr | Ser | Met | Leu | His | Arg | Lys |
|     |     |     |     | 125 |     |     |     |     | 130 |     |     |     |     | 135 |
| His | Trp | Glu | His | His | Asn | His | Thr | Gly | Glu | Val | Gly | Lys | Asp | Pro |
|     |     |     |     | 140 |     |     |     |     | 145 |     |     |     |     | 150 |
| Asp | Phe | His | Lys | Gly | Asn | Pro | Gly | Leu | Val | Pro | Trp | Phe | Ala | Ser |
|     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |     |     |     |     | 165 |
| Phe | Met | Ser | Ser | Tyr | Met | Ser | Leu | Trp | Gln | Phe | Ala | Arg | Leu | Ala |
|     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |     |     |     | 180 |
| Trp | Trp | Ala | Val | Val | Met | Gln | Met | Leu | Gly | Ala | Pro | Met | Ala | Asn |
|     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |     |     | 195 |
| Leu | Leu | Val | Phe | Met | Ala | Ala | Ala | Pro | Ile | Leu | Ser | Ala | Phe | Arg |
|     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |     | 210 |
| Leu | Phe | Tyr | Phe | Gly | Thr | Tyr | Leu | Pro | His | Lys | Pro | Glu | Pro | Gly |

|   |     |     |
|---|-----|-----|
| 215   | 220 | 225 |
| Pro Ala Ala Gly Ser Gln Val Met Ala Trp Phe Arg Ala Lys Thr |     |     |
| 230   | 235 | 240 |
| Ser Glu Ala Ser Asp Val Met Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe |     |     |
| 245   | 250 | 255 |
| Asp Leu His Trp Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp |     |     |
| 260   | 265 | 270 |
| Gln Leu Pro His Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro |     |     |
| 275   | 280 | 285 |
| Ala Leu Ala   |     |     |
| 288   |     |     |

配列番号 : 4

配列の長さ : 1 6 7 7

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA

起源

生物名 : *Haematococcus pluvialis*

株名 : NIES-144

配列

|   |     |
|---|-----|
| CGGGGCAACT CAAGAAATTC AACAGCTGCA AGCGCGCCCC AGCCTCACAG CGCCAAGTGA | 60  |
| GCTATCGACG TGTTGTGAG CGCTCGACGT GGTCCACTGA CGGGCCTGTG AGCCTCTGCC  | 120 |
| CTCCGTCCTC TGCCAAATCT CGCGTCGGGG CCTGCCTAAG TCGAAGAATG CAC GTC    | 176 |

Met His Val

1

|   |     |
|---|-----|
| GCA TCG GCA CTA ATG GTC GAG CAG AAA GGC AGT GAG GCA GCT GCT TCC | 224 |
| Ala Ser Ala Leu Met Val Glu Gln Lys Gly Ser Glu Ala Ala Ala Ser |     |

|   |     |     |     |
|---|-----|-----|-----|
| 5   | 10  | 15  |     |
| AGC CCA GAC GTC TTG AGA GCG TGG GCG ACA CAG TAT CAC ATG CCA TCC |     |     | 272 |
| Ser Pro Asp Val Leu Arg Ala Trp Ala Thr Gln Tyr His Met Pro Ser |     |     |     |
| 20  | 25  | 30  | 35  |
| GAG TCG TCA GAC GCA GCT CGT CCT GCG CTA AAG CAC GCC TAC AAA CCT |     |     | 320 |
| Glu Ser Ser Asp Ala Ala Arg Pro Ala Leu Lys His Ala Tyr Lys Pro |     |     |     |
| 40  | 45  | 50  |     |
| CCA GCA TCT GAC GCC AAG GGC ATC ACG ATG GCG CTG ACC ATC ATT GGC |     |     | 368 |
| Pro Ala Ser Asp Ala Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Thr Ile Ile Gly |     |     |     |
| 55  | 60  | 65  |     |
| ACC TGG ACC GCA GTG TTT TTA CAC GCA ATA TTT CAA ATC AGG CTA CCG |     |     | 416 |
| Thr Trp Thr Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Arg Leu Pro |     |     |     |
| 70  | 75  | 80  |     |
| ACA TCC ATG GAC CAG CTT CAC TGG TTG CCT GTG TCC GAA GCC ACA GCC |     |     | 464 |
| Thr Ser Met Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Glu Ala Thr Ala |     |     |     |
| 85  | 90  | 95  |     |
| CAG CTT TTG GGC GGA AGC AGC AGC CTA CTG CAC ATC GCT GCA GTC TTC |     |     | 512 |
| Gln Leu Leu Gly Gly Ser Ser Ser Leu Leu His Ile Ala Ala Val Phe |     |     |     |
| 100   | 105 | 110 | 115 |
| ATT GTA CTT GAG TTC CTG TAC ACT GGT CTA TTC ATC ACC ACA CAT GAC |     |     | 560 |
| Ile Val Leu Glu Phe Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp |     |     |     |
| 120   | 125 | 130 |     |
| GCA ATG CAT GGC ACC ATA GCT TTG AGG CAC AGG CAG CTC AAT GAT CTC |     |     | 608 |
| Ala Met His Gly Thr Ile Ala Leu Arg His Arg Gln Leu Asn Asp Leu |     |     |     |
| 135   | 140 | 145 |     |
| CTT GGC AAC ATC TGC ATA TCA CTG TAC GCC TGG TTT GAC TAC AGC ATG |     |     | 656 |
| Leu Gly Asn Ile Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Ser Met |     |     |     |
| 150   | 155 | 160 |     |
| CTG CAT CGC AAG CAC TGG GAG CAC CAC AAC CAT ACT GGC GAA GTG GGG |     |     | 704 |

WO 96/06172

Leu His Arg Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly  
 165 170 175  
 AAA GAC CCT GAC TTC CAC AAG GGA AAT CCC GGC CTT GTC CCC TGG TTC 752  
 Lys Asp Pro Asp Phe His Lys Gly Asn Pro Gly Leu Val Pro Trp Phe  
 180 185 190 195  
 GCC AGC TTC ATG TCC AGC TAC ATG TCC CTG TGG CAG TTT GCC CGG CTG 800  
 Ala Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Leu Trp Gln Phe Ala Arg Leu  
 200 205 210  
 GCA TGG TGG GCA GTG GTG ATG CAA ATG CTG GGG GCG CCC ATG GCA AAT 848  
 Ala Trp Trp Ala Val Val Met Gln Met Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn  
 215 220 225  
 CTC CTA GTC TTC ATG GCT GCA GCC CCA ATC TTG TCA GCA TTC CGC CTC 896  
 Leu Leu Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg Leu  
 230 235 240  
 TTC TAC TTC GGC ACT TAC CTG CCA CAC AAG CCT GAG CCA GGC CCT GCA 944  
 Phe Tyr Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Pro Ala  
 245 250 255  
 GCA GGC TCT CAG GTG ATG GCC TGG TTC AGG GCC AAG ACA AGT GAG GCA 992  
 Ala Gly Ser Gln Val Met Ala Trp Phe Arg Ala Lys Thr Ser Glu Ala  
 260 265 270 275  
 TCT GAT GTG ATG AGT TTC CTG ACA TGC TAC CAC TTT GAC CTG CAC TGG 1040  
 Ser Asp Val Met Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp  
 280 285 290  
 GAG CAC CAC AGG TGG CCC TTT GCC CCC TGG TGG CAG CTG CCC CAC TGC 1088  
 Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Gln Leu Pro His Cys  
 295 300 305  
 CGC CGC CTG TCC GGC CGT GGC CTG GTG CCT GCC TTG GCA TGACCTGGTC 1137  
 Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Leu Ala  
 310 315 320



3 6

|   |     |
|---|-----|
| AAG CAC GCC TAC AAA CCT CCA GCA TCT GAC GCC AAG GGC ATC ACG | 180 |
| Lys His Ala Tyr Lys Pro Pro Ala Ser Asp Ala Lys Gly Ile Thr |     |
| 50 55 60  |     |
| ATG GCG CTG ACC ATC ATT GGC ACC TGG ACC GCA GTG TTT TTA CAC | 225 |
| Met Ala Leu Thr Ile Ile Gly Thr Trp Thr Ala Val Phe Leu His |     |
| 65 70 75  |     |
| GCA ATA TTT CAA ATC AGG CTA CCG ACA TCC ATG GAC CAG CTT CAC | 270 |
| Ala Ile Phe Gln Ile Arg Leu Pro Thr Ser Met Asp Gln Leu His |     |
| 80 85 90  |     |
| TGG TTG CCT GTG TCC GAA GCC ACA GCC CAG CTT TTG GGC GGA AGC | 315 |
| Trp Leu Pro Val Ser Glu Ala Thr Ala Gln Leu Leu Gly Gly Ser |     |
| 95 100 105  |     |
| AGC AGC CTA CTG CAC ATC GCT GCA GTC TTC ATT GTA CTT GAG TTC | 360 |
| Ser Ser Leu Leu His Ile Ala Ala Val Phe Ile Val Leu Glu Phe |     |
| 110 115 120   |     |
| CTG TAC ACT GGT CTA TTC ATC ACC ACA CAT GAC GCA ATG CAT GGC | 405 |
| Leu Tyr Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly |     |
| 125 130 135   |     |
| ACC ATA GCT TTG AGG CAC AGG CAG CTC AAT GAT CTC CTT GGC AAC | 450 |
| Thr Ile Ala Leu Arg His Arg Gln Leu Asn Asp Leu Leu Gly Asn |     |
| 140 145 150   |     |
| ATC TGC ATA TCA CTG TAC GCC TGG TTT GAC TAC AGC ATG CTG CAT | 495 |
| Ile Cys Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Ser Met Leu His |     |
| 155 160 165   |     |
| CGC AAG CAC TGG GAG CAC CAC AAC CAT ACT GGC GAA GTG GGG AAA | 540 |
| Arg Lys His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys |     |
| 170 175 180   |     |
| GAC CCT GAC TTC CAC AAG GGA AAT CCC GGC CTT GTC CCC TGG TTC | 585 |
| Asp Pro Asp Phe His Lys Gly Asn Pro Gly Leu Val Pro Trp Phe |     |

|   |     |     |     |
|---|-----|-----|-----|
| 185   | 190 | 195 |     |
| GCC AGC TTC ATG TCC AGC TAC ATG TCC CTG TGG CAG TTT GCC CGG |     |     | 630 |
| Ala Ser Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Leu Trp Gln Phe Ala Arg |     |     |     |
| 200   | 205 | 210 |     |
| CTG GCA TGG TGG GCA GTG GTG ATG CAA ATG CTG GGG GCG CCC ATG |     |     | 675 |
| Leu Ala Trp Trp Ala Val Val Met Gln Met Leu Gly Ala Pro Met |     |     |     |
| 215   | 220 | 225 |     |
| GCA AAT CTC CTA GTC TTC ATG GCT GCA GCC CCA ATC TTG TCA GCA |     |     | 720 |
| Ala Asn Leu Leu Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala |     |     |     |
| 230   | 235 | 240 |     |
| TTC CGC CTC TTC TAC TTC GGC ACT TAC CTG CCA CAC AAG CCT GAG |     |     | 765 |
| Phe Arg Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Glu |     |     |     |
| 245   | 250 | 255 |     |
| CCA GGC CCT GCA GCA GGC TCT CAG GTG ATG GCC TGG TTC AGG GCC |     |     | 810 |
| Pro Gly Pro Ala Ala Gly Ser Gln Val Met Ala Trp Phe Arg Ala |     |     |     |
| 260   | 265 | 270 |     |
| AAG ACA AGT GAG GCA TCT GAT GTG ATG AGT TTC CTG ACA TGC TAC |     |     | 855 |
| Lys Thr Ser Glu Ala Ser Asp Val Met Ser Phe Leu Thr Cys Tyr |     |     |     |
| 275   | 280 | 285 |     |
| CAC TTT GAC CTG CAC TGG GAG CAC CAC AGG TGG CCC TTT GCC CCC |     |     | 900 |
| His Phe Asp Leu His Trp Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro |     |     |     |
| 290   | 295 | 300 |     |
| TGG TGG CAG CTG CCC CAC TGC CGC CGC CTG TCC GGG CGT GGC CTG |     |     | 945 |
| Trp Trp Gln Leu Pro His Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu |     |     |     |
| 305   | 310 | 315 |     |
| GTG CCT GCC TTG GCA TGA                                     |     |     | 963 |
| Val Pro Ala Leu Ala   |     |     |     |
| 320   |     |     |     |

配列番号 : 6

配列の長さ : 9 4 2

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : c D N A

起源

生物名 : *Haematococcus pluvialis*

株名 : NIES-144

配列

|   |     |
|---|-----|
| ATG GTC GAG CAG AAA GGC AGT GAG GCA GCT GCT TCC AGC CCA GAC | 45  |
| Met Val Glu Gln Lys Gly Ser Glu Ala Ala Ala Ser Ser Pro Asp |     |
| 1 5 10 15   |     |
| GTC TTG AGA GCG TGG GCG ACA CAG TAT CAC ATG CCA TCC GAG TCG | 90  |
| Val Leu Arg Ala Trp Ala Thr Gln Tyr His Met Pro Ser Glu Ser |     |
| 20 25 30  |     |
| TCA GAC GCA GCT CGT CCT GCG CTA AAG CAC GCC TAC AAA CCT CCA | 135 |
| Ser Asp Ala Ala Arg Pro Ala Leu Lys His Ala Tyr Lys Pro Pro |     |
| 35 40 45  |     |
| GCA TCT GAC GCC AAG GGC ATC ACG ATG GCG CTG ACC ATC ATT GGC | 180 |
| Ala Ser Asp Ala Lys Gly Ile Thr Met Ala Leu Thr Ile Ile Gly |     |
| 50 55 60  |     |
| ACC TGG ACC GCA GTG TTT TTA CAC GCA ATA TTT CAA ATC AGG CTA | 225 |
| Thr Trp Thr Ala Val Phe Leu His Ala Ile Phe Gln Ile Arg Leu |     |
| 65 70 75  |     |
| CCG ACA TCC ATG GAC CAG CTT CAC TGG TTG CCT GTG TCC GAA GCC | 270 |
| Pro Thr Ser Met Asp Gln Leu His Trp Leu Pro Val Ser Glu Ala |     |
| 80 85 90  |     |
| ACA GCC CAG CTT TTG GGC GGA AGC AGC AGC CTA CTG CAC ATC GCT | 315 |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
| Thr | Ala | Gln | Leu | Leu | Gly | Gly | Ser | Ser | Ser | Leu | Leu | His | Ile | Ala |     |  |  |
|     |     |     |     | 95  |     |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |  |  |
| GCA | GTC | TTC | ATT | GTA | CTT | GAG | TTC | CTG | TAC | ACT | GGT | CTA | TTC | ATC | 360 |  |  |
| Ala | Val | Phe | Ile | Val | Leu | Glu | Phe | Leu | Tyr | Thr | Gly | Leu | Phe | Ile |     |  |  |
|     |     |     |     | 110 |     |     |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |  |  |
| ACC | ACA | CAT | GAC | GCA | ATG | CAT | GGC | ACC | ATA | GCT | TTG | AGG | CAC | AGG | 405 |  |  |
| Thr | Thr | His | Asp | Ala | Met | His | Gly | Thr | Ile | Ala | Leu | Arg | His | Arg |     |  |  |
|     |     |     |     | 125 |     |     |     |     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |  |  |
| CAG | CTC | AAT | GAT | CTC | CTT | GGC | AAC | ATC | TGC | ATA | TCA | CTG | TAC | GCC | 450 |  |  |
| Gln | Leu | Asn | Asp | Leu | Leu | Gly | Asn | Ile | Cys | Ile | Ser | Leu | Tyr | Ala |     |  |  |
|     |     |     |     | 140 |     |     |     |     | 145 |     |     |     |     | 150 |     |  |  |
| TGG | TTT | GAC | TAC | AGC | ATG | CTG | CAT | CGC | AAG | CAC | TGG | GAG | CAC | CAC | 495 |  |  |
| Trp | Phe | Asp | Tyr | Ser | Met | Leu | His | Arg | Lys | His | Trp | Glu | His | His |     |  |  |
|     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |     |     |     |     | 165 |     |  |  |
| AAC | CAT | ACT | GGC | GAA | GTG | GGG | AAA | GAC | CCT | GAC | TTC | CAC | AAG | GGA | 540 |  |  |
| Asn | His | Thr | Gly | Glu | Val | Gly | Lys | Asp | Pro | Asp | Phe | His | Lys | Gly |     |  |  |
|     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |     |     |     | 180 |     |  |  |
| AAT | CCC | GGC | CTT | GTG | CCC | TGG | TTC | GCC | AGC | TTC | ATG | TCC | AGC | TAC | 585 |  |  |
| Asn | Pro | Gly | Leu | Val | Pro | Trp | Phe | Ala | Ser | Phe | Met | Ser | Ser | Tyr |     |  |  |
|     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |     |     | 195 |     |  |  |
| ATG | TCC | CTG | TGG | CAG | TTT | GCC | CGG | CTG | GCA | TGG | TGG | GCA | GTG | GTG | 630 |  |  |
| Met | Ser | Leu | Trp | Gln | Phe | Ala | Arg | Leu | Ala | Trp | Trp | Ala | Val | Val |     |  |  |
|     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |     | 210 |     |  |  |
| ATG | CAA | ATG | CTG | GGG | GCG | CCC | ATG | GCA | AAT | CTC | CTA | GTC | TTC | ATG | 675 |  |  |
| Met | Gln | Met | Leu | Gly | Ala | Pro | Met | Ala | Asn | Leu | Leu | Val | Phe | Met |     |  |  |
|     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     | 225 |     |  |  |
| GCT | GCA | GCC | CCA | ATC | TTG | TCA | GCA | TTC | CGC | CTC | TTC | TAC | TTC | GGC | 720 |  |  |
| Ala | Ala | Ala | Pro | Ile | Leu | Ser | Ala | Phe | Arg | Leu | Phe | Tyr | Phe | Gly |     |  |  |
|     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |     |  |  |



ACT TAC CTG CCA CAC AAG CCT GAG CCA GGC CCT GCA GCA GGC TCT 765  
Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Glu Pro Gly Pro Ala Ala Gly Ser  
245 250 255

CAG GTG ATG GCC TGG TTC AGG GCC AAG ACA AGT GAG GCA TCT GAT 810  
Gln Val Met Ala Trp Phe Arg Ala Lys Thr Ser Glu Ala Ser Asp  
260 265 270

GTG ATG AGT TTC CTG ACA TGC TAC CAC TTT GAC CTG CAC TGG GAG 855  
Val Met Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe Asp Leu His Trp Glu  
275 280 285

CAC CAC AGG TGG CCC TTT GCC CCC TGG TGG CAG CTG CCC CAC TGC 900  
His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp Gln Leu Pro His Cys  
290 295 300

CGC CGC CTG TCC GGG CGT GGC CTG GTG CCT GCC TTG GCA TGA 942  
Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro Ala Leu Ala  
305 310 313

配列番号 : 7

配列の長さ : 8 6 7

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA

起源

生物名 : *Haematococcus pluvialis*

株名 : NIES-144

配列

ATG CCA TCC GAG TCG TCA GAC GCA GCT CGT CCT GCG CTA AAG CAC 45  
Met Pro Ser Glu Ser Ser Asp Ala Ala Arg Pro Ala Leu Lys His  
1 5 10 15

|   |     |
|---|-----|
| GCC TAC AAA CCT CCA GCA TCT GAC GCC AAG GGC ATC ACG ATG GCG | 90  |
| Ala Tyr Lys Pro Pro Ala Ser Asp Ala Lys Gly Ile Thr Met Ala |     |
| 20 25 30  |     |
| CTG ACC ATC ATT GGC ACC TGG ACC GCA GTG TTT TTA CAC GCA ATA | 135 |
| Leu Thr Ile Ile Gly Thr Trp Thr Ala Val Phe Leu His Ala Ile |     |
| 35 40 45  |     |
| TTT CAA ATC AGG CTA CCG ACA TCC ATG GAC CAG CTT CAC TGG TTG | 180 |
| Phe Gln Ile Arg Leu Pro Thr Ser Met Asp Gln Leu His Trp Leu |     |
| 50 55 60  |     |
| CCT GTG TCC GAA GCC ACA GCC CAG CTT TTG GGC GGA AGC AGC AGC | 225 |
| Pro Val Ser Glu Ala Thr Ala Gln Leu Leu Gly Gly Ser Ser Ser |     |
| 65 70 75  |     |
| CTA CTG CAC ATC GCT GCA GTC TTC ATT GTA CTT GAG TTC CTG TAC | 270 |
| Leu Leu His Ile Ala Ala Val Phe Ile Val Leu Glu Phe Leu Tyr |     |
| 80 85 90  |     |
| ACT GGT CTA TTC ATC ACC ACA CAT GAC GCA ATG CAT GGC ACC ATA | 315 |
| Thr Gly Leu Phe Ile Thr Thr His Asp Ala Met His Gly Thr Ile |     |
| 95 100 105  |     |
| GCT TTG AGG CAC AGG CAG CTC AAT GAT CTC CTT GGC AAC ATC TGC | 360 |
| Ala Leu Arg His Arg Gln Leu Asn Asp Leu Leu Gly Asn Ile Cys |     |
| 110 115 120   |     |
| ATA TCA CTG TAC GCC TGG TTT GAC TAC AGC ATG CTG CAT CGC AAG | 405 |
| Ile Ser Leu Tyr Ala Trp Phe Asp Tyr Ser Met Leu His Arg Lys |     |
| 125 130 135   |     |
| CAC TGG GAG CAC CAC AAC CAT ACT GGC GAA GTG GGG AAA GAC CCT | 450 |
| His Trp Glu His His Asn His Thr Gly Glu Val Gly Lys Asp Pro |     |
| 140 145 150   |     |
| GAC TTC CAC AAG GGA AAT CCC GGC CTT GTC CCC TGG TTC GCC AGC | 495 |
| Asp Phe His Lys Gly Asn Pro Gly Leu Val Pro Trp Phe Ala Ser |     |

|   |     |     |     |
|---|-----|-----|-----|
| 155   | 160 | 165 |     |
| TTC ATG TCC AGC TAC ATG TCC CTG TGG CAG TTT GCC CGG CTG GCA |     |     | 540 |
| Phe Met Ser Ser Tyr Met Ser Leu Trp Gln Phe Ala Arg Leu Ala |     |     |     |
| 170   | 175 | 180 |     |
| TGG TGG GCA GTG GTG ATG CAA ATG CTG GGG GCG CCC ATG GCA AAT |     |     | 585 |
| Trp Trp Ala Val Val Met Gln Met Leu Gly Ala Pro Met Ala Asn |     |     |     |
| 185   | 190 | 195 |     |
| CTC CTA GTC TTC ATG GCT GCA GCC CCA ATC TTG TCA GCA TTC CGC |     |     | 630 |
| Leu Leu Val Phe Met Ala Ala Ala Pro Ile Leu Ser Ala Phe Arg |     |     |     |
| 200   | 205 | 210 |     |
| CTC TTC TAC TTC GGC ACT TAC CTG CCA CAC AAG CCT GAG CCA GGC |     |     | 675 |
| Leu Phe Tyr Phe Gly Thr Tyr Leu Pro His Lys Pro Glu Pro Gly |     |     |     |
| 215   | 220 | 225 |     |
| CCT GCA GCA GGC TCT CAG GTG ATG GCC TGG TTC AGG GCC AAG ACA |     |     | 720 |
| Pro Ala Ala Gly Ser Gln Val Met Ala Trp Phe Arg Ala Lys Thr |     |     |     |
| 230   | 235 | 240 |     |
| AGT GAG GCA TCT GAT GTG ATG AGT TTC CTG ACA TGC TAC CAC TTT |     |     | 765 |
| Ser Glu Ala Ser Asp Val Met Ser Phe Leu Thr Cys Tyr His Phe |     |     |     |
| 245   | 250 | 255 |     |
| GAC CTG CAC TGG GAG CAC CAC AGG TGG CCC TTT GCC CCC TGG TGG |     |     | 810 |
| Asp Leu His Trp Glu His His Arg Trp Pro Phe Ala Pro Trp Trp |     |     |     |
| 260   | 265 | 270 |     |
| CAG CTG CCC CAC TGC CGC CGC CTG TCC GGG CGT GGC CTG GTG CCT |     |     | 855 |
| Gln Leu Pro His Cys Arg Arg Leu Ser Gly Arg Gly Leu Val Pro |     |     |     |
| 275   | 280 | 285 |     |
| GCC TTG GCA TGA   |     |     | 867 |
| Ala Leu Ala   |     |     |     |

## 請求の範囲

1.  $\beta$ -イオノン環を有する化合物の $\beta$ -イオノン環の4位のメチレン基をケト基に転換する酵素活性を有するポリペプチド。
2. 実質的に配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列を含む請求の範囲第1項記載のポリペプチド。
3. 実質的に配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列を含む請求の範囲第1項記載のポリペプチド。
4. 実質的に配列表の配列番号3に示されるアミノ酸配列を含む請求の範囲第1項記載のポリペプチド。
5.  $\beta$ -イオノン環を有する化合物が $\beta$ -カロチンである請求の範囲第1～4項のいずれかに記載のポリペプチド。
6.  $\beta$ -イオノン環がその3位の位置で1つの水素原子が水酸基により置換されていてもよい請求の範囲第1～4項のいずれかに記載のポリペプチド。
7. 3位の位置で1つの水素原子が水酸基により置換されている $\beta$ -イオノン環を有する化合物がゼアキサンチンである請求の範囲第6項記載のポリペプチド。
8.  $\beta$ -イオノン環を有する化合物の $\beta$ -イオノン環の4位のメチレン基をケト基に転換する酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含むDNA。
9.  $\beta$ -イオノン環を有する化合物の $\beta$ -イオノン環の4位のメチレン基をケト基に転換する酵素活性を有するポリペプチドであって、実質的に配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする塩基配列を含む請求の範囲第8項記載のDNA。
10. 配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする塩基配列が配列表の配列番号4に示されるものである請求の範囲第9項記載のDNA。
11. 配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする塩基配列が配列表の配列番号5に示されるものである請求の範囲第9項記載のDNA。
12.  $\beta$ -イオノン環を有する化合物の $\beta$ -イオノン環の4位のメチレン基をケト基に転換する酵素活性を有するポリペプチドであって、実質的に配列表の配列番

号2に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする塩基配列を含む請求の範囲第8項記載のDNA。

13. 配列表の配列番号2に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする塩基配列が配列表の配列番号6に示されるものである請求の範囲第12項記載のDNA。

14.  $\beta$ -イオノン環を有する化合物の $\beta$ -イオノン環の4位のメチレン基をケト基に転換する酵素活性を有するポリペプチドであって、実質的に配列表の配列番号3に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする塩基配列を含む請求の範囲第8項記載のDNA。

15. 配列表の配列番号3に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする塩基配列が配列表の配列番号7に示されるものである請求の範囲第14項記載のDNA。

16.  $\beta$ -イオノン環を有する化合物が $\beta$ -カロチンである請求の範囲第8～15項のいずれかに記載のDNA。

17.  $\beta$ -イオノン環がその3位の位置で1つの水素原子が水酸基により置換されていてもよい請求の範囲第8～15項のいずれかに記載のDNA。

18. 3位の位置で1つの水素原子が水酸基により置換されている $\beta$ -イオノン環を有する化合物がゼアキサンチンである請求の範囲第17項記載のDNA。

19. 請求の範囲第8～18項のいずれかに記載のDNAにハイブリダイズし、 $\beta$ -イオノン環を有する化合物の $\beta$ -イオノン環の4位のメチレン基をケト基に転換する酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含むDNA。

20. プラスミドpHP51に挿入されていて、 $\beta$ -イオノン環を有する化合物の $\beta$ -イオノン環の4位のメチレン基をケト基に転換する酵素活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含むDNA。

21. 請求の範囲第8、19および20項のいずれかに記載のDNAを含む組換えベクター。

22. 請求の範囲第8、19および20項のいずれかに記載のDNAを導入した微生物。

23. 請求の範囲第22項記載の微生物を培地で培養し、培養物からケトカロチノイドを採取することを特徴とする、ケトカロチノイドの製造法。



24. ケトカロチノイドがエキネノンおよびカンタキサンチンからなる群より選択される少なくとも一種の化合物である請求の範囲第23項記載の方法。
25. ケトカロチノイドが4-ケトゼアキサンチンおよびアスタキサンチンからなる群より選択される少なくとも一種の化合物である請求の範囲第23項記載の方法。
26. 請求の範囲第22項記載の微生物が細菌または酵母である請求の範囲第23項記載の方法。

## 第1図

|   |     |      |     |      |     |      |     |      |     |      |     |      |     |     |     |     |     |     |
|---|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| A |     | 176  |     | 185  |     | 194  |     | 203  |     | 212  |     | 221  |     |     |     |     |     |     |
| ↓ | ATG | CAC  | GTC | GCA  | TCG | GCA  | CTA | ATG  | GTC | GAG  | CAG | AAA  | GGC | AGT | GAG | GCA | GCT | GCT |
|   | Met | His  | Val | Ala  | Ser | Ala  | Leu | Met  | Val | Glu  | Gln | Lys  | Gly | Ser | Glu | Ala | Ala | Ala |
|   |     | 230  |     | 239  |     | 248  |     | 257  |     | 266  |     | 275  |     |     |     |     |     |     |
|   | TCC | AGC  | CCA | GAC  | GTC | TTG  | AGA | GCG  | TGG | GCG  | ACA | CAG  | TAT | CAC | ATG | CCA | TCC | GAG |
|   | Ser | Ser  | Pro | Asp  | Val | Leu  | Arg | Ala  | Trp | Ala  | Thr | Gln  | Tyr | His | Met | Pro | Ser | Glu |
|   |     | 284  |     | 293  |     | 302  |     | 311  |     | 320  |     | 329  |     |     |     |     |     |     |
|   | TCG | TCA  | GAC | GCA  | GCT | CGT  | CCT | GCG  | CTA | AAG  | CAC | GCC  | TAC | AAA | CCT | CCA | GCA | TCT |
|   | Ser | Ser  | Asp | Ala  | Ala | Arg  | Pro | Ala  | Leu | Lys  | His | Ala  | Tyr | Lys | Pro | Pro | Ala | Ser |
|   |     | 338  |     | 347  |     | 356  |     | 365  |     | 374  |     | 383  |     |     |     |     |     |     |
|   | GAC | GCC  | AAG | GGC  | ATC | ACG  | ATG | GCG  | CTG | ACC  | ATC | ATT  | GGC | ACC | TGG | ACC | GCA | GTG |
|   | Asp | Ala  | Lys | Gly  | Ile | Thr  | Met | Ala  | Leu | Thr  | Ile | Ile  | Gly | Thr | Trp | Thr | Ala | Val |
|   |     | 392  |     | 401  |     | 410  |     | 419  |     | 428  |     | 437  |     |     |     |     |     |     |
|   | TTT | TTA  | CAC | GCA  | ATA | TTT  | CAA | ATC  | AGG | CTA  | CCG | ACA  | TCC | ATG | GAC | CAG | CTT | CAC |
|   | Phe | Leu  | His | Ala  | Ile | Phe  | Gln | Ile  | Arg | Leu  | Pro | Thr  | Ser | Met | Asp | Gln | Leu | His |
|   |     | 446  |     | 455  |     | 464  |     | 473  |     | 482  |     | 491  |     |     |     |     |     |     |
|   | TGG | TTG  | CCT | GTG  | TCC | GAA  | GCC | ACA  | GCC | CAG  | CTT | TTG  | GGC | GGA | AGC | AGC | AGC | CTA |
|   | Trp | Leu  | Pro | Val  | Ser | Glu  | Ala | Thr  | Ala | Gln  | Leu | Leu  | Gly | Gly | Ser | Ser | Ser | Leu |
|   |     | 500  |     | 509  |     | 518  |     | 527  |     | 536  |     | 545  |     |     |     |     |     |     |
|   | CTG | CAC  | ATC | GCT  | GCA | GTC  | TTC | ATT  | GTA | CTT  | GAG | TTC  | CTG | TAC | ACT | GGT | CTA | TTC |
|   | Leu | His  | Ile | Ala  | Ala | Val  | Phe | Ile  | Val | Leu  | Glu | Phe  | Leu | Tyr | Thr | Gly | Leu | Phe |
|   |     | 554  |     | 563  |     | 572  |     | 581  |     | 590  |     | 599  |     |     |     |     |     |     |
|   | ATC | ACC  | ACA | CAT  | GAC | GCA  | ATG | CAT  | GGC | ACC  | ATA | GCT  | TTG | AGG | CAC | AGG | CAG | CTC |
|   | Ile | Thr  | Thr | His  | Asp | Ala  | Met | His  | Gly | Thr  | Ile | Ala  | Leu | Arg | His | Arg | Gln | Leu |
|   |     | 608  |     | 617  |     | 626  |     | 635  |     | 644  |     | 653  |     |     |     |     |     |     |
|   | AAT | GAT  | CTC | CTT  | GGC | AAC  | ATC | TGC  | ATA | TCA  | CTG | TAC  | GCC | TGG | TTT | GAC | TAC | AGC |
|   | Asn | Asp  | Leu | Leu  | Gly | Asn  | Ile | Cys  | Ile | Ser  | Leu | Tyr  | Ala | Trp | Phe | Asp | Tyr | Ser |
|   |     | 662  |     | 671  |     | 680  |     | 689  |     | 698  |     | 707  |     |     |     |     |     |     |
|   | ATG | CTG  | CAT | CGC  | AAG | CAC  | TGG | GAG  | CAC | CAC  | AAC | CAT  | ACT | GGC | GAA | GTG | GGG | AAA |
|   | Met | Leu  | His | Arg  | Lys | His  | Trp | Glu  | His | His  | Asn | His  | Thr | Gly | Glu | Val | Gly | Lys |
|   |     | 716  |     | 725  |     | 734  |     | 743  |     | 752  |     | 761  |     |     |     |     |     |     |
|   | GAC | CCT  | GAC | TTC  | CAC | AAG  | GGA | AAT  | CCC | GGC  | CTT | GTC  | CCC | TGG | TTC | GCC | AGC | TTC |
|   | Asp | Pro  | Asp | Phe  | His | Lys  | Gly | Asn  | Pro | Gly  | Leu | Val  | Pro | Trp | Phe | Ala | Ser | Phe |
|   |     | 770  |     | 779  |     | 788  |     | 797  |     | 806  |     | 815  |     |     |     |     |     |     |
|   | ATG | TCC  | AGC | TAC  | ATG | TCC  | CTG | TGG  | CAG | TTT  | GCC | CGG  | CTG | GCA | TGG | TGG | GCA | GTG |
|   | Met | Ser  | Ser | Tyr  | Met | Ser  | Leu | Trp  | Gln | Phe  | Ala | Arg  | Leu | Ala | Trp | Trp | Ala | Val |
|   |     | 824  |     | 833  |     | 842  |     | 851  |     | 860  |     | 869  |     |     |     |     |     |     |
|   | GTG | ATG  | CAA | ATG  | CTG | GGG  | GCG | CCC  | ATG | GCA  | AAT | CTC  | CTA | GTC | TTC | ATG | GCT | GCA |
|   | Val | Met  | Gln | Met  | Leu | Gly  | Ala | Pro  | Met | Ala  | Asn | Leu  | Leu | Val | Phe | Met | Ala | Ala |
|   |     | 878  |     | 887  |     | 896  |     | 905  |     | 914  |     | 923  |     |     |     |     |     |     |
|   | GCC | CCA  | ATC | TTG  | TCA | GCA  | TTC | CGC  | CTC | TTC  | TAC | TTC  | GGC | ACT | TAC | CTG | CCA | CAC |
|   | Ala | Pro  | Ile | Leu  | Ser | Ala  | Phe | Arg  | Leu | Phe  | Tyr | Phe  | Gly | Thr | Tyr | Leu | Pro | His |
|   |     | 932  |     | 941  |     | 950  |     | 959  |     | 968  |     | 977  |     |     |     |     |     |     |
|   | AAG | CCT  | GAG | CCA  | GGC | CCT  | GCA | GCA  | GGC | TCT  | CAG | GTG  | ATG | GCC | TGG | TTC | AGG | GCC |
|   | Lys | Pro  | Glu | Pro  | Gly | Pro  | Ala | Ala  | Gly | Ser  | Gln | Val  | Met | Ala | Trp | Phe | Arg | Ala |
|   |     | 986  |     | 995  |     | 1004 |     | 1013 |     | 1022 |     | 1031 |     |     |     |     |     |     |
|   | AAG | ACA  | AGT | GAG  | GCA | TCT  | GAT | GTG  | ATG | AGT  | TTC | CTG  | ACA | TGC | TAC | CAC | TTT | GAC |
|   | Lys | Thr  | Ser | Glu  | Ala | Ser  | Asp | Val  | Met | Ser  | Phe | Leu  | Thr | Cys | Tyr | His | Phe | Asp |
|   |     | 1040 |     | 1049 |     | 1058 |     | 1067 |     | 1076 |     | 1085 |     |     |     |     |     |     |
|   | CTG | CAC  | TGG | GAG  | CAC | CAC  | AGG | TGG  | CCC | TTT  | GCC | CCC  | TGG | TGG | CAG | CTG | CCC | CAC |
|   | Leu | His  | Trp | Glu  | His | His  | Arg | Trp  | Pro | Phe  | Ala | Pro  | Trp | Trp | Gln | Leu | Pro | His |
|   |     | 1094 |     | 1103 |     | 1112 |     | 1121 |     | 1130 |     |      |     |     |     |     |     |     |
|   | TGC | CGC  | CGC | CTG  | TCC | GGG  | CGT | GGC  | CTG | GTG  | CCT | GCC  | TTG | GCA | TGA |     |     |     |
|   | Cys | Arg  | Arg | Leu  | Ser | Gly  | Arg | Gly  | Leu | Val  | Pro | Ala  | Leu | Ala | *** |     |     |     |

D

## 第2図

B

|     |     |      |     |     |      |     |     |      |     |     |      |     |     |      |     |     |      |
|-----|-----|------|-----|-----|------|-----|-----|------|-----|-----|------|-----|-----|------|-----|-----|------|
| ATG | GTC | 197  |     |     | 206  |     |     | 215  |     | 224 |      | 233 |     | 242  |     |     |      |
| Met | Val | GAG  | CAG | AAA | GGC  | AGT | GAG | GCA  | GCT | GCT | TCC  | AGC | CCA | GAC  | GTC | TTG | AGA  |
|     |     | 251  | Gln | Lys | Gly  | Ser | Glu | Ala  | Ala | Ala | Ser  | Ser | Pro | Asp  | Val | Leu | Arg  |
| GCG | TGG | GCG  | ACA | CAG | TAT  | CAC | ATG | CCA  | TCC | GAG | TCG  | TCA | GAC | GCA  | GCT | CGT | CCT  |
| Ala | Trp | Ala  | Thr | Gln | Tyr  | His | Met | Pro  | Ser | Glu | Ser  | Ser | Asp | Ala  | Ala | Arg | Pro  |
|     |     | 305  |     |     | 314  |     |     | 323  |     |     | 332  |     |     | 341  |     |     | 350  |
| GCG | CTA | AAG  | CAC | GCC | TAC  | AAA | CCT | CCA  | GCA | TCT | GAC  | GCC | AAG | GGC  | ATC | ACG | ATG  |
| Ala | Leu | Lys  | His | Ala | Tyr  | Lys | Pro | Pro  | Ala | Ser | Asp  | Ala | Lys | Gly  | Ile | Thr | Met  |
|     |     | 359  |     |     | 368  |     |     | 377  |     |     | 386  |     |     | 395  |     |     | 404  |
| GCG | CTG | ACC  | ATC | ATT | GGC  | ACC | TGG | ACC  | GCA | GTG | TTT  | TTA | CAC | GCA  | ATA | TTT | CAA  |
| Ala | Leu | Thr  | Ile | Ile | Gly  | Thr | Trp | Thr  | Ala | Val | Phe  | Leu | His | Ala  | Ile | Phe | Gln  |
|     |     | 413  |     |     | 422  |     |     | 431  |     |     | 440  |     |     | 449  |     |     | 458  |
| ATC | AGG | CTA  | CCG | ACA | TCC  | ATG | GAC | CAG  | CTT | CAC | TGG  | TTG | CCT | GTG  | TCC | GAA | GCC  |
| Ile | Arg | Leu  | Pro | Thr | Ser  | Met | Asp | Gln  | Leu | His | Trp  | Leu | Pro | Val  | Ser | Glu | Ala  |
|     |     | 467  |     |     | 476  |     |     | 485  |     |     | 494  |     |     | 503  |     |     | 512  |
| ACA | GCC | CAG  | CTT | TTG | GGC  | GGA | AGC | AGC  | AGC | CTA | CTG  | CAC | ATC | GCT  | GCA | GTC | TTC  |
| Thr | Ala | Gln  | Leu | Leu | Gly  | Gly | Ser | Ser  | Ser | Leu | Leu  | His | Ile | Ala  | Ala | Val | Phe  |
|     |     | 521  |     |     | 530  |     |     | 539  |     |     | 548  |     |     | 557  |     |     | 566  |
| ATT | GTA | CTT  | GAG | TTC | CTG  | TAC | ACT | GGT  | CTA | TTC | ATC  | ACC | ACA | CAT  | GAC | GCA | ATG  |
| Ile | Val | Leu  | Glu | Phe | Leu  | Tyr | Thr | Gly  | Leu | Phe | Ile  | Thr | Thr | His  | Asp | Ala | Met  |
|     |     | 575  |     |     | 584  |     |     | 593  |     |     | 602  |     |     | 611  |     |     | 620  |
| CAT | GGC | ACC  | ATA | GCT | TTG  | AGG | CAC | AGG  | CAG | CTC | AAT  | GAT | CTC | CTT  | GGC | AAC | ATC  |
| His | Gly | Thr  | Ile | Ala | Leu  | Arg | His | Arg  | Gln | Leu | Asn  | Asp | Leu | Leu  | Gly | Asn | Ile  |
|     |     | 629  |     |     | 638  |     |     | 647  |     |     | 656  |     |     | 665  |     |     | 674  |
| TGC | ATA | TCA  | CTG | TAC | GCC  | TGG | TTT | GAC  | TAC | AGC | ATG  | CTG | CAT | CGC  | AAG | CAC | TGG  |
| Cys | Ile | Ser  | Leu | Tyr | Ala  | Trp | Phe | Asp  | Tyr | Ser | Met  | Leu | His | Arg  | Lys | His | Trp  |
|     |     | 683  |     |     | 692  |     |     | 701  |     |     | 710  |     |     | 719  |     |     | 728  |
| GAG | CAC | CAC  | AAC | CAT | ACT  | GGC | GAA | GTG  | GGG | AAA | GAC  | CCT | GAC | TTC  | CAC | AAG | GGA  |
| Glu | His | His  | Asn | His | Thr  | Gly | Glu | Val  | Gly | Lys | Asp  | Pro | Asp | Phe  | His | Lys | Gly  |
|     |     | 737  |     |     | 746  |     |     | 755  |     |     | 764  |     |     | 773  |     |     | 782  |
| AAT | CCC | GGC  | CTT | GTC | CCC  | TGG | TTC | GCC  | AGC | TTC | ATG  | TCC | AGC | TAC  | ATG | TCC | CTG  |
| Asn | Pro | Gly  | Leu | Val | Pro  | Trp | Phe | Ala  | Ser | Phe | Met  | Ser | Ser | Tyr  | Met | Ser | Leu  |
|     |     | 791  |     |     | 800  |     |     | 809  |     |     | 818  |     |     | 827  |     |     | 836  |
| TGG | CAG | TTT  | GCC | CGG | CTG  | GCA | TGG | TGG  | GCA | GTG | GTG  | ATG | CAA | ATG  | CTG | GGG | GCG  |
| Trp | Gln | Phe  | Ala | Arg | Leu  | Ala | Trp | Trp  | Ala | Val | Met  | Gln | Met | Leu  | Gly | Ala |      |
|     |     | 845  |     |     | 854  |     |     | 863  |     |     | 872  |     |     | 881  |     |     | 890  |
| CCC | ATG | GCA  | AAT | CTC | CTA  | GTC | TTC | ATG  | GCT | GCA | GCC  | CCA | ATC | TTG  | TCA | GCA | TTC  |
| Pro | Met | Ala  | Asn | Leu | Leu  | Val | Phe | Met  | Ala | Ala | Ala  | Pro | Ile | Leu  | Ser | Ala | Phe  |
|     |     | 899  |     |     | 908  |     |     | 917  |     |     | 926  |     |     | 935  |     |     | 944  |
| CGC | CTC | TTC  | TAC | TTC | GGC  | ACT | TAC | CTG  | CCA | CAC | AAG  | CCT | GAG | CCA  | GGC | CCT | GCA  |
| Arg | Leu | Phe  | Tyr | Phe | Gly  | Thr | Tyr | Leu  | Pro | His | Lys  | Pro | Glu | Pro  | Gly | Pro | Ala  |
|     |     | 953  |     |     | 962  |     |     | 971  |     |     | 980  |     |     | 989  |     |     | 998  |
| GCA | GGC | TCT  | CAG | GTG | ATG  | GCC | TGG | TTC  | AGG | GCC | AAG  | ACA | AGT | GAG  | GCA | TCT | GAT  |
| Ala | Gly | Ser  | Gln | Val | Met  | Ala | Trp | Phe  | Arg | Ala | Lys  | Thr | Ser | Glu  | Ala | Ser | Asp  |
|     |     | 1007 |     |     | 1016 |     |     | 1025 |     |     | 1034 |     |     | 1043 |     |     | 1052 |
| GTG | ATG | AGT  | TTC | CTG | ACA  | TGC | TAC | CAC  | TTT | GAC | CTG  | CAC | TGG | GAG  | CAC | CAC | AGG  |
| Val | Met | Ser  | Phe | Leu | Thr  | Cys | Tyr | His  | Phe | Asp | Leu  | His | Trp | Glu  | His | His | Arg  |
|     |     | 1061 |     |     | 1070 |     |     | 1079 |     |     | 1088 |     |     | 1097 |     |     | 1106 |
| TGG | CCC | TTT  | GCC | CCC | TGG  | TGG | CAG | CTG  | CCC | CAC | TGC  | CGC | CGC | CTG  | TCC | GGG | CGT  |
| Trp | Pro | Phe  | Ala | Pro | Trp  | Trp | Gln | Leu  | Pro | His | Cys  | Arg | Arg | Leu  | Ser | Gly | Arg  |
|     |     | 1115 |     |     | 1124 |     |     |      |     |     |      |     |     |      |     |     |      |
| GGC | CTG | GTG  | CCT | GCC | TTG  | GCA | TGA |      |     |     |      |     |     |      |     |     |      |
| Gly | Leu | Val  | Pro | Ala | Leu  | Ala | --- |      |     |     |      |     |     |      |     |     |      |

D

## 第3図

|     |     |      |     |      |     |      |     |      |     |      |     |      |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| C   |     | 272  |     | 281  |     | 290  |     | 299  |     | 308  |     | 317  |     |     |     |     |     |     |
| ↓   | ATG | CCA  | TCC | GAG  | TCG | TCA  | GAC | GCA  | GCT | CGT  | CCT | GCG  | CTA | AAG | CAC | GCC | TAC | AAA |
|     | Met | Pro  | Ser | Glu  | Ser | Ser  | Asp | Ala  | Ala | Arg  | Pro | Ala  | Leu | Lys | His | Ala | Tyr | Lys |
|     |     | 326  |     | 335  |     | 344  |     | 353  |     | 362  |     | 371  |     |     |     |     |     |     |
|     | CCT | CCA  | GCA | TCT  | GAC | GCC  | AAG | GGC  | ATC | ACG  | ATG | GCG  | CTG | ACC | ATC | ATT | GGC | ACC |
|     | Pro | Pro  | Ala | Ser  | Asp | Ala  | Lys | Gly  | Ile | Thr  | Met | Ala  | Leu | Thr | Ile | Ile | Gly | Thr |
|     |     | 380  |     | 389  |     | 398  |     | 407  |     | 416  |     | 425  |     |     |     |     |     |     |
|     | TGG | ACC  | GCA | GTG  | TTT | TTA  | CAC | GCA  | ATA | TTT  | CAA | ATC  | AGG | CTA | CCG | ACA | TCC | ATG |
|     | Trp | Thr  | Ala | Val  | Phe | Leu  | His | Ala  | Ile | Phe  | Gln | Ile  | Arg | Leu | Pro | Thr | Ser | Met |
|     |     | 434  |     | 443  |     | 452  |     | 461  |     | 470  |     | 479  |     |     |     |     |     |     |
|     | GAC | CAG  | CTT | CAC  | TGG | TTG  | CCT | GTG  | TCC | GAA  | GCC | ACA  | GCC | CAG | CTT | TTG | GGC | GGA |
|     | Asp | Gln  | Leu | His  | Trp | Leu  | Pro | Val  | Ser | Glu  | Ala | Thr  | Ala | Gln | Leu | Leu | Gly | Gly |
|     |     | 488  |     | 497  |     | 506  |     | 515  |     | 524  |     | 533  |     |     |     |     |     |     |
|     | AGC | AGC  | AGC | CTA  | CTG | CAC  | ATC | GCT  | GCA | GTC  | TTC | ATT  | GTA | CTT | GAG | TTC | CTG | TAC |
|     | Ser | Ser  | Ser | Leu  | Leu | His  | Ile | Ala  | Ala | Val  | Phe | Ile  | Val | Leu | Glu | Phe | Leu | Tyr |
|     |     | 542  |     | 551  |     | 560  |     | 569  |     | 578  |     | 587  |     |     |     |     |     |     |
|     | ACT | GGT  | CTA | TTC  | ATC | ACC  | ACA | CAT  | GAC | GCA  | ATG | CAT  | GGC | ACC | ATA | GCT | TTG | AGG |
|     | Thr | Gly  | Leu | Phe  | Ile | Thr  | Thr | His  | Asp | Ala  | Met | His  | Gly | Thr | Ile | Ala | Leu | Arg |
|     |     | 596  |     | 605  |     | 614  |     | 623  |     | 632  |     | 641  |     |     |     |     |     |     |
|     | CAC | AGG  | CAG | CTC  | AAT | GAT  | CTC | CTT  | GGC | AAC  | ATC | TGC  | ATA | TCA | CTG | TAC | GCC | TGG |
|     | His | Arg  | Gln | Leu  | Asn | Asp  | Leu | Leu  | Gly | Asn  | Ile | Cys  | Ile | Ser | Leu | Tyr | Ala | Trp |
|     |     | 650  |     | 659  |     | 668  |     | 677  |     | 686  |     | 695  |     |     |     |     |     |     |
|     | TTT | GAC  | TAC | AGC  | ATG | CTG  | CAT | CGC  | AAG | CAC  | TGG | GAG  | CAC | CAC | AAC | CAT | ACT | GGC |
|     | Phe | Asp  | Tyr | Ser  | Met | Leu  | His | Arg  | Lys | His  | Trp | Glu  | His | His | Asn | His | Thr | Gly |
|     |     | 704  |     | 713  |     | 722  |     | 731  |     | 740  |     | 749  |     |     |     |     |     |     |
|     | GAA | GTG  | GGG | AAA  | GAC | CCT  | GAC | TTC  | CAC | AAG  | GGA | AAT  | CCC | GGC | CTT | GTC | CCC | TGG |
|     | Glu | Val  | Gly | Lys  | Asp | Pro  | Asp | Phe  | His | Lys  | Gly | Asn  | Pro | Gly | Leu | Val | Pro | Trp |
|     |     | 758  |     | 767  |     | 776  |     | 785  |     | 794  |     | 803  |     |     |     |     |     |     |
|     | TTC | GCC  | AGC | TTC  | ATG | TCC  | AGC | TAC  | ATG | TCC  | CTG | TGG  | CAG | TTT | GCC | CGG | CTG | GCA |
|     | Phe | Ala  | Ser | Phe  | Met | Ser  | Ser | Tyr  | Met | Ser  | Leu | Trp  | Gln | Phe | Ala | Arg | Leu | Ala |
|     |     | 812  |     | 821  |     | 830  |     | 839  |     | 848  |     | 857  |     |     |     |     |     |     |
|     | TGG | TGG  | GCA | GTG  | GTG | ATG  | CAA | ATG  | CTG | GGG  | GCG | CCC  | ATG | GCA | AAT | CTC | CTA | GTC |
|     | Trp | Trp  | Ala | Val  | Val | Met  | Gln | Met  | Leu | Gly  | Ala | Pro  | Met | Ala | Asn | Leu | Leu | Val |
|     |     | 866  |     | 875  |     | 884  |     | 893  |     | 902  |     | 911  |     |     |     |     |     |     |
|     | TTC | ATG  | GCT | GCA  | GCC | CCA  | ATC | TTG  | TCA | GCA  | TTC | CGC  | CTC | TTC | TAC | TTC | GGC | ACT |
|     | Phe | Met  | Ala | Ala  | Ala | Pro  | Ile | Leu  | Ser | Ala  | Phe | Arg  | Leu | Phe | Tyr | Phe | Gly | Thr |
|     |     | 920  |     | 929  |     | 938  |     | 947  |     | 956  |     | 965  |     |     |     |     |     |     |
|     | TAC | CTG  | CCA | CAC  | AAG | CCT  | GAG | CCA  | GGC | CCT  | GCA | GCA  | GGC | TCT | CAG | GTG | ATG | GCC |
|     | Tyr | Leu  | Pro | His  | Lys | Pro  | Glu | Pro  | Gly | Pro  | Ala | Ala  | Gly | Ser | Gln | Val | Met | Ala |
|     |     | 974  |     | 983  |     | 992  |     | 1001 |     | 1010 |     | 1019 |     |     |     |     |     |     |
|     | TGG | TTC  | AGG | GCC  | AAG | ACA  | AGT | GAG  | GCA | TCT  | GAT | GTG  | ATG | AGT | TTC | CTG | ACA | TGC |
|     | Trp | Phe  | Arg | Ala  | Lys | Thr  | Ser | Glu  | Ala | Ser  | Asp | Val  | Met | Ser | Phe | Leu | Thr | Cys |
|     |     | 1028 |     | 1037 |     | 1046 |     | 1055 |     | 1064 |     | 1073 |     |     |     |     |     |     |
|     | TAC | CAC  | TTT | GAC  | CTG | CAC  | TGG | GAG  | CAC | CAC  | AGG | TGG  | CCC | TTT | GCC | CCC | TGG | TGG |
|     | Tyr | His  | Phe | Asp  | Leu | His  | Trp | Glu  | His | His  | Arg | Trp  | Pro | Phe | Ala | Pro | Trp | Trp |
|     |     | 1082 |     | 1091 |     | 1100 |     | 1109 |     | 1118 |     | 1127 |     |     |     |     |     |     |
|     | CAG | CTG  | CCC | CAC  | TGC | CGC  | CGC | CTG  | TCC | GGG  | CGT | GGC  | CTG | GTG | CCT | GCC | TTG | GCA |
|     | Gln | Leu  | Pro | His  | Cys | Arg  | Arg | Leu  | Ser | Gly  | Arg | Gly  | Leu | Val | Pro | Ala | Leu | Ala |
| TGA |     |      |     |      |     |      |     |      |     |      |     |      |     |     |     |     |     |     |
| --- |     |      |     |      |     |      |     |      |     |      |     |      |     |     |     |     |     |     |
| *** |     |      |     |      |     |      |     |      |     |      |     |      |     |     |     |     |     |     |
|     |     |      |     |      |     |      |     |      |     |      |     |      |     |     |     |     |     | D   |

## 第4図

30 60  
CGGGGCAACT CAAGAAATTC AACAGCTGCA AGCGCGCCCC AGCCTCACAG CGCCAAGTGA  
GCCCCGTTGA GTTCTTTAAG TTGTCGACGT TCGCGCGGGG TCGGAGTGTC GCGGTTCACT

90 120  
GCTATCGACG TGGTTGTGAG CGCTCGACGT GGTCCACTGA CGGGCCTGTG AGCCTCTGCG  
CGATAGCTGC ACCAACACTC GCGAGCTGCA CCAGGTGACT GCCCGGACAC TCGGAGACGC

150 180  
CTCCGTCCTC TGCCAAATCT CGCGTCGGGG CCTGCCTAAG TCGAAGAATG CACGTCGCAT  
GAGGCAGGAG ACGGTTTAGA GCGCAGCCCC GGACGGATTG AGCTTCTTAC GTGCAGCGTA

210 240  
CGGCACTAAT GGTGAGCAG AAAGGCAGTG AGGCAGCTGC TTCCAGCCCA GACGTCTTGA  
GCCGTGATTA CCAGCTCGTC TTTCCGTCAC TCCGTCGACG AAGGTCGGGT CTGCAGAACT

270 300  
GAGCGTGGGC GACACAGTAT CACATGCCAT CCGAGTCGTC AGACGCAGCT CGTCCTGCGC  
CTCGCACCCG CTGTGTCATA GTGTACGGTA GGCTCAGCAG TCTGCGTCGA GCAGGACGCG

330 360  
TAAAGCACGC CTACAAACCT CCAGCATCTG ACGCCAAGGG CATCACGATG GCGCTGACCA  
ATTTCTGTGCG GATGTTTGA GGTGCTAGAC TGCGGTTCCC GTAGTGCTAC CGCGACTGGT

390 420  
TCATTGGCAC CTGGACCGCA GTGTTTTTAC ACGCAATATT TCAAATCAGG CTACCGACAT  
AGTAACCGTG GACCTGGCGT CACAAAATG TGCGTTATAA AGTTTAGTCC GATGGCTGTA

450 480  
CCATGGACCA GCTTCACTGG TTGCCTGTGT CCGAAGCCAC AGCCCAGCTT TTGGGCGGAA  
GGTACCTGGT CGAAGTGACC AACGGACACA GGCTTCGGTG TCGGGTCGAA AACCCGCCTT

510 540  
GCAGCAGCCT ACTGCACATC GCTGCAGTCT TCATTGTACT TGAGTTCCTG TACACTGGTC  
CGTCGTCGGA TGACGTGTAG CGACGTCAGA AGTAACATGA ACTCAAGGAC ATGTGACCAG

570 600  
TATTCATCAC CACACATGAC GCAATGCATG GCACCATAGC TTTGAGGCAC AGGCAGCTCA  
ATAAGTAGTG GTGTGTACTG CGTTACGTAC CGTGGTATCG AAACCTCCGTG TCCGTCGAGT

630 660  
ATGATCTCCT TGGCAACATC TGCATATCAC TGTACGCCTG GTTTGACTAC AGCATGCTGC  
TACTAGAGGA ACCGTTGTAG ACGTATAGTG ACATGCGGAC CAAACTGATG TCGTACGACG

690 720  
ATCGCAAGCA CTGGGAGCAC CACAACCATA CTGGCGAAGT GGGGAAAGAC CCTGACTTCC  
TAGCGTTTCGT GACCCTCGTG GTGTTGGTAT GACCGCTTCA CCCCTTTCTG GGACTGAAGG

750 780  
ACAAGGGAAA TCCCGGCCTT GTCCCCTGGT TCGCCAGCTT CATGTCCAGC TACATGTCCC  
TGTTCCCTTT AGGGCCGGAA CAGGGGACCA AGCGGTCGAA GTACAGGTCTG ATGTACAGGG

810 840  
TGTGGCAGTT TGCCCGGCTG GCATGGTGGG CAGTGGTGAT GCAAATGCTG GGGGCGCCCA  
ACACCGTCAA ACGGGCCGAC CGTACCACCC GTCACCACTA CGTTTACGAC CCCC GCGGGT

## 第5図

870 900  
TGGCAAATCT CCTAGTCTTC ATGGCTGCAG CCCCAATCTT GTCAGCATTG CGCCTCTTCT  
ACCGTTTAGA GGATCAGAAG TACCGACGTC GGGGTTAGAA CAGTCGTAAG GCGGAGAAGA

930 960  
ACTTCGGCAC TTACCTGCCA CACAAGCCTG AGCCAGGCCG TGCAGCAGGC TCTCAGGTGA  
TGAAGCCGTG AATGGACGGT GTGTTCGGAC TCGGTCCGGG ACGTCGTCCG AGAGTCCACT

990 1020  
TGGCCTGGTT CAGGGCCAAG ACAAGTGAGG CATCTGATGT GATGAGTTTC CTGACATGCT  
ACCGGACCAA GTCCCGGTTT TGTTCACCTC GTAGACTACA CTACTCAAAG GACTGTACGA

1050 1080  
ACCACTTTGA CCTGCACTGG GAGCACCACA GGTGGCCCTT TGCCCCCTGG TGGCAGCTGC  
TGGTGAAACT GGACGTGACC CTCGTGGTGT CCACCGGGAA ACGGGGGACC ACCGTCGACG

1110 1140  
CCCACTGCCG CCGCCTGTCC GGGCGTGGCC TGGTGCCTGC CTTGGCATGA CCTGGTCCCT  
GGGTGACGGC GGCGGACAGG CCCGCACCGG ACCACGGACG GAACCGTACT GGACCAGGGA

1170 1200  
CCGCTGGTGA CCCAGCGTCT GCACAAGAGT GTCATGCTAC AGGGTGCTGC GGCCAGTGCC  
GGCGACCACT GGGTCGCAGA CGTGTCTCTA CAGTACGATG TCCCACGACG CCGGTCACCG

1230 1260  
AGCGCAGTGC ACTCTCAGCC TGTATGGGGC TACCGCTGTG CCACTGAGCA CTGGGCATGC  
TCGCGTCACG TGAGAGTEGG ACATACCCCG ATGGCGACAC GGTGACTCGT GACCCGTACG

1290 1320  
CACTGAGCAC TGGGCGTGCT ACTGAGCAAT GGGCGTGCTA CTGAGCAATG GGCGTGCTAC  
GTGACTCGTG ACCCGCACGA TGAATCGTTA CCCGCACGAT GACTCGTTAC CCGCACGATG

1350 1380  
TGACAATGGG CGTGCTACTG GGGTCTGGCA GTGGCTAGGA TGGAGTTTGA TGCATTCACT  
ACTGTTACCC GCACGATGAC CCCAGACCGT CACCGATCCT ACCTCAAAT ACGTAAGTCA

1410 1440  
AGCGGTGGCC AACGTCATGT GGATGGTGGA AGTGCTGAGG GGTTTAGGCA GCCGGCATTG  
TCGCCACCGG TTGCAGTACA CCTACCACCT TCACGACTCC CCAAATCCGT CGGCCGTAAA

1470 1500  
GAGAGGGCTA AGTTATAAAT CGCATGCTGC TCATGCGCAC ATATCTGCAC ACAGCCAGGG  
CTCTCCCGAT TCAATATTTA GCGTACGACG AGTACGCGTG TATAGACGTG TGTCGGTCCC

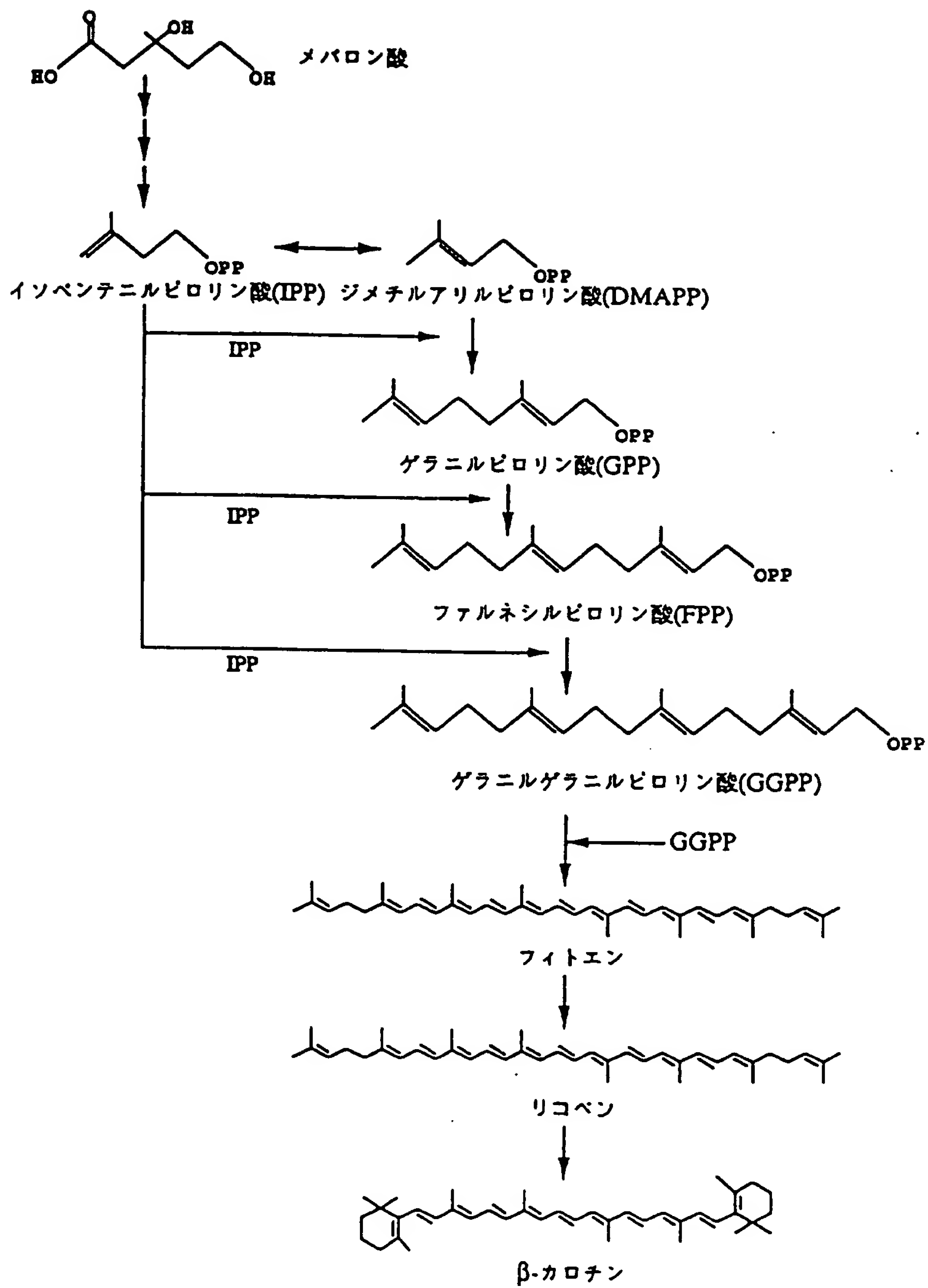
1530 1560  
AAATCCCTTC GAGAGTGATT ATGGGACACT TGTATTGGTT TCGTGCTATT GTTTTATTCA  
TTTAGGGAAG CTCTCACTAA TACCCTGTGA ACATAACCAA AGCACGATAA CAAATAAGT

1590 1620  
GCAGCAGTAC TTAGTGAGGG TGAGAGCAGG GTGGTGAGAG TGGAGTGAGT GAGTATGAAC  
CGTCGTCATG AATCACTCCC ACTCTCGTCC CACCACTCTC ACCTCACTCA CTCATACTTG

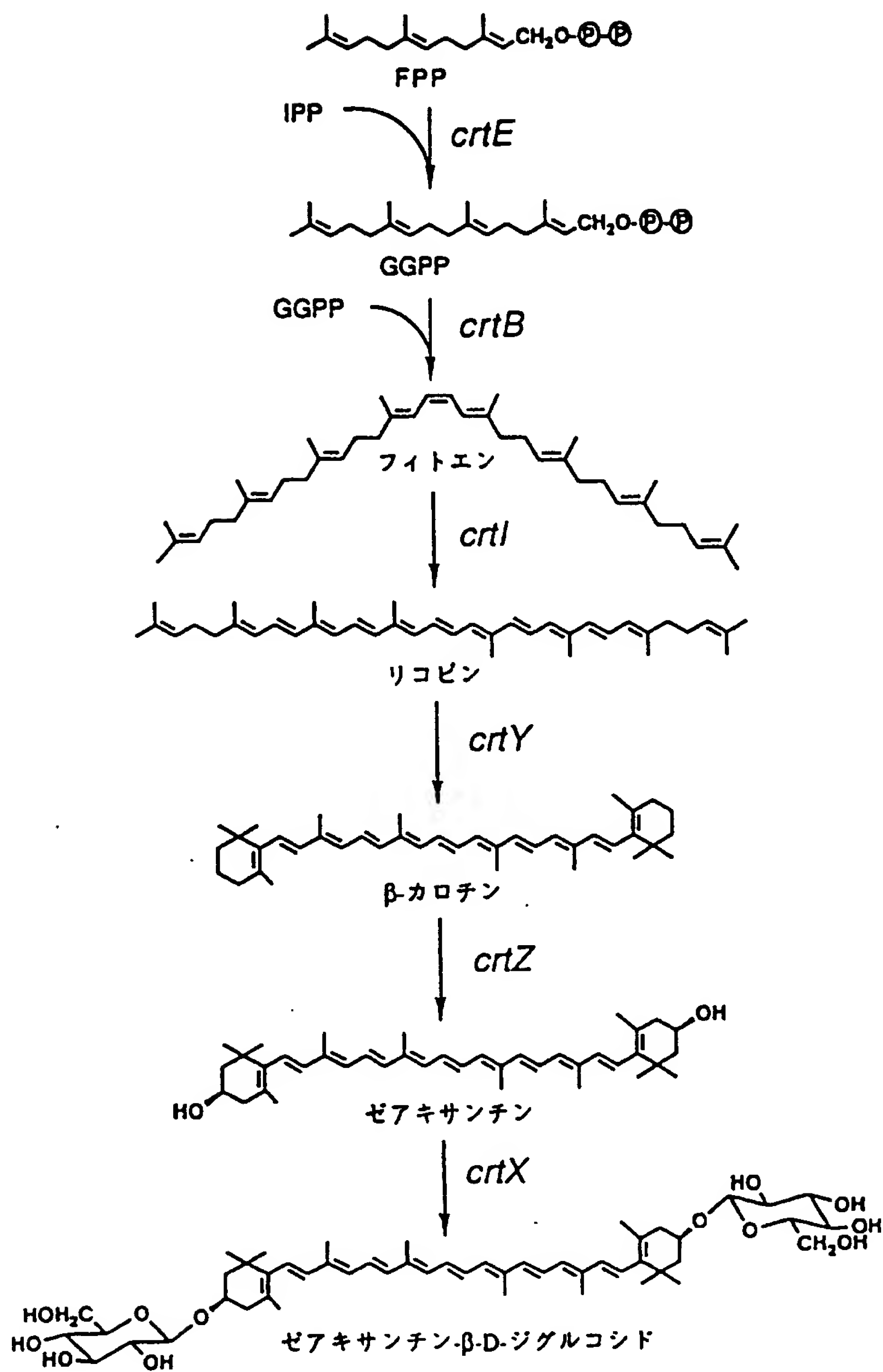
1650 1677  
CTGGTCAGCG AGGTGAACAG CCTGTAATGA ATGACTCTGT CTAACAAAAA AAAAAA  
GACCAGTCGC TCCACTTGTC GGACATTACT TACTGAGACA GATTTTTTTT TTTTTT



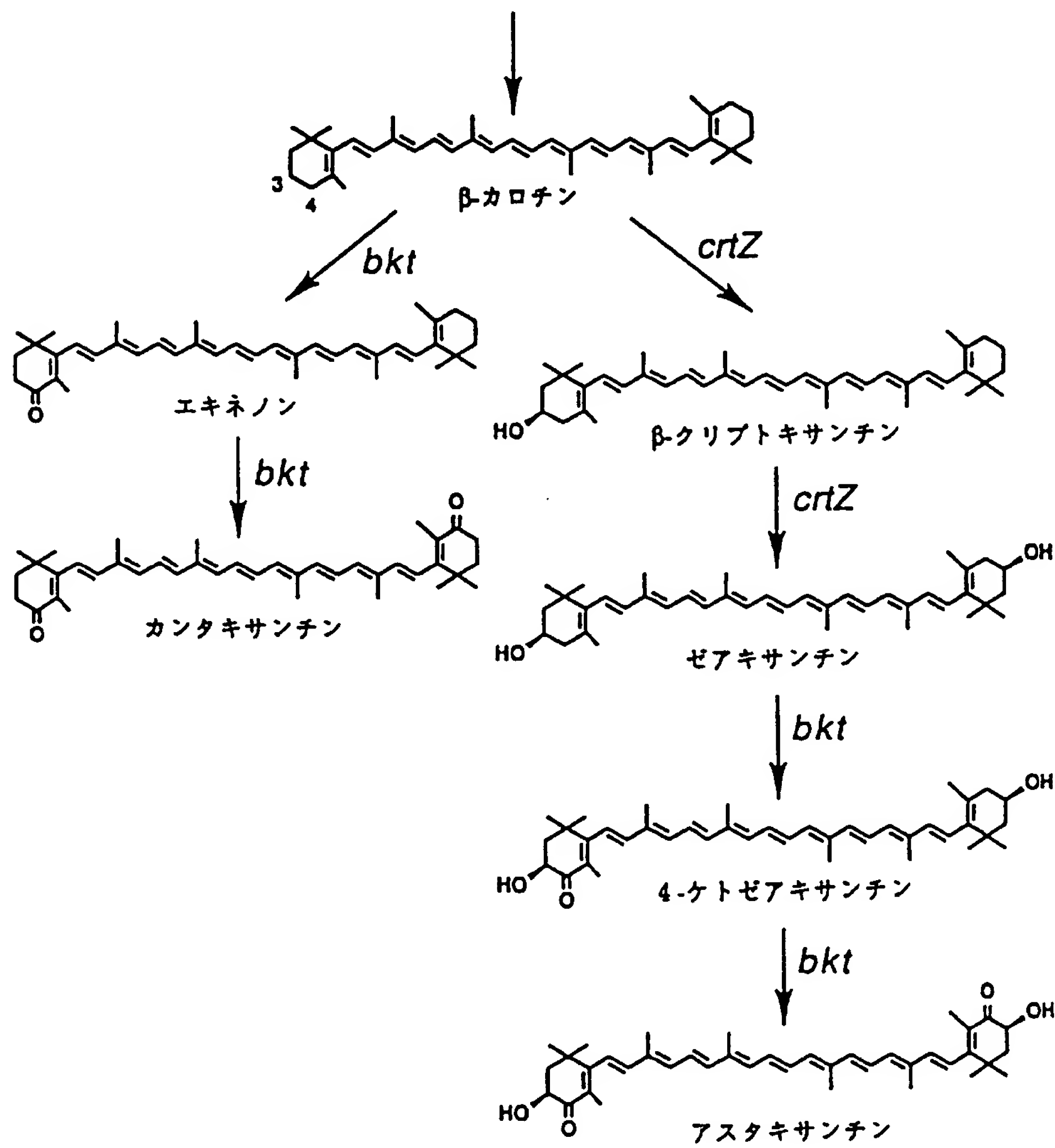
第6図



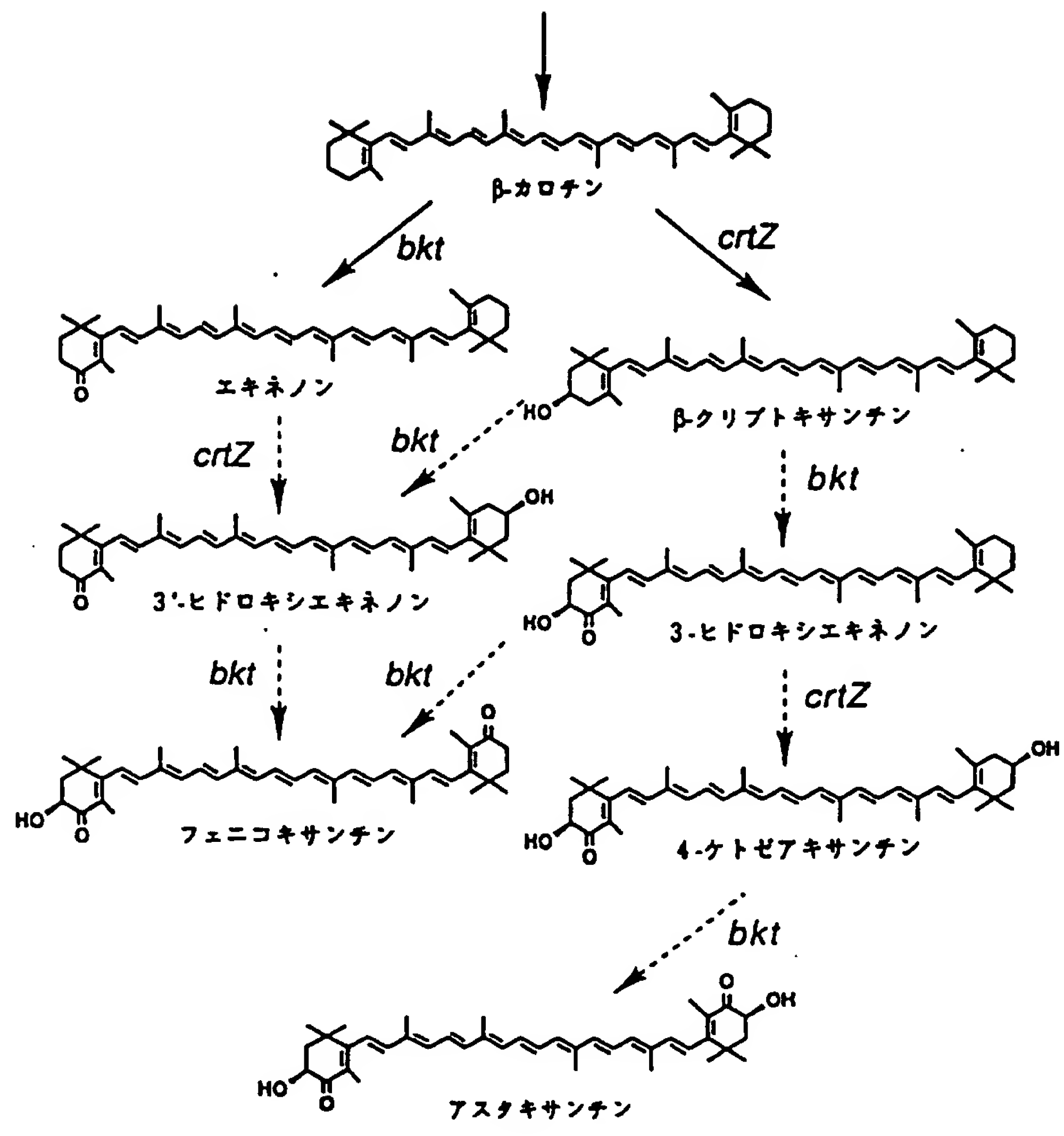
## 第7図



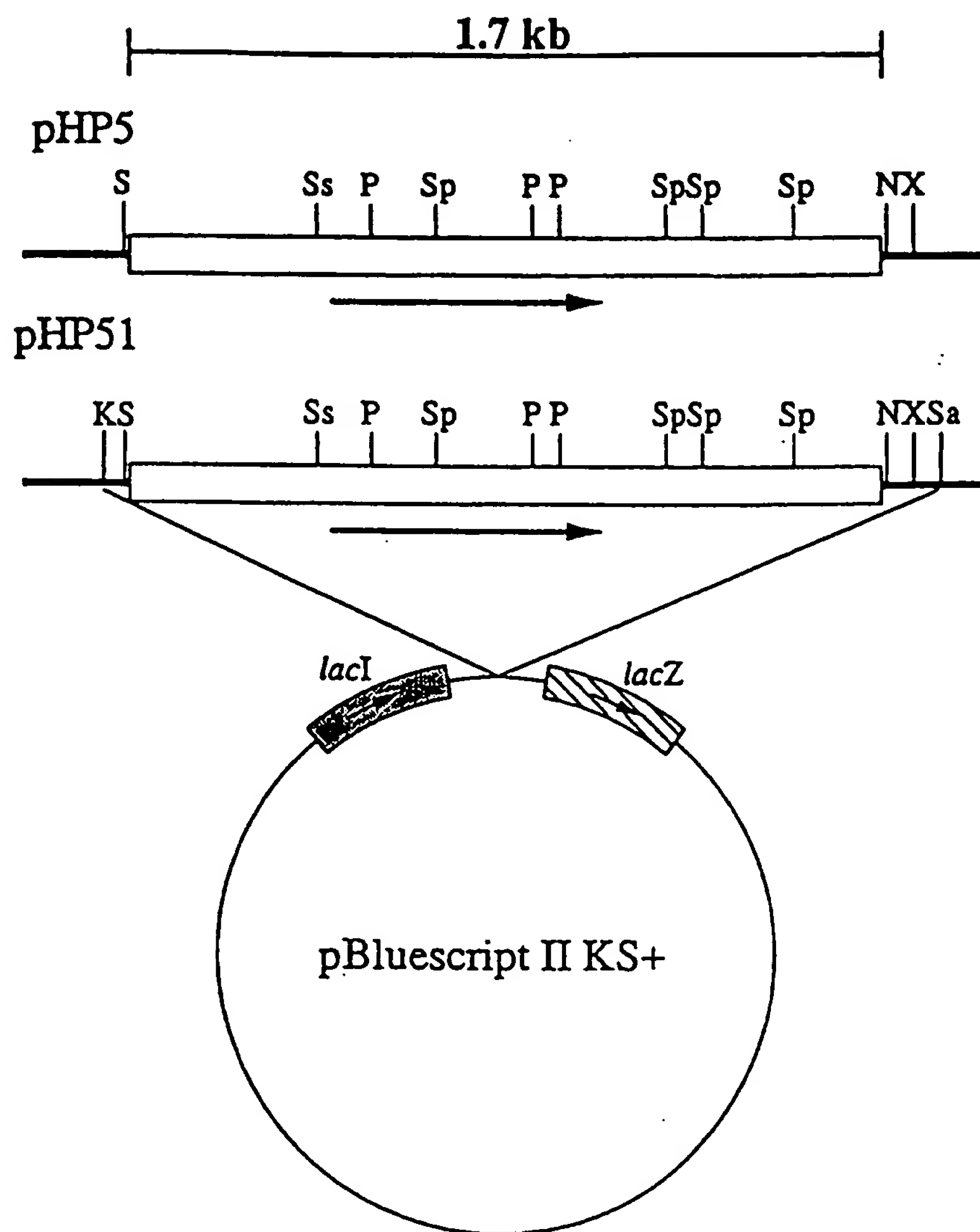
第8図



第9図



第10図

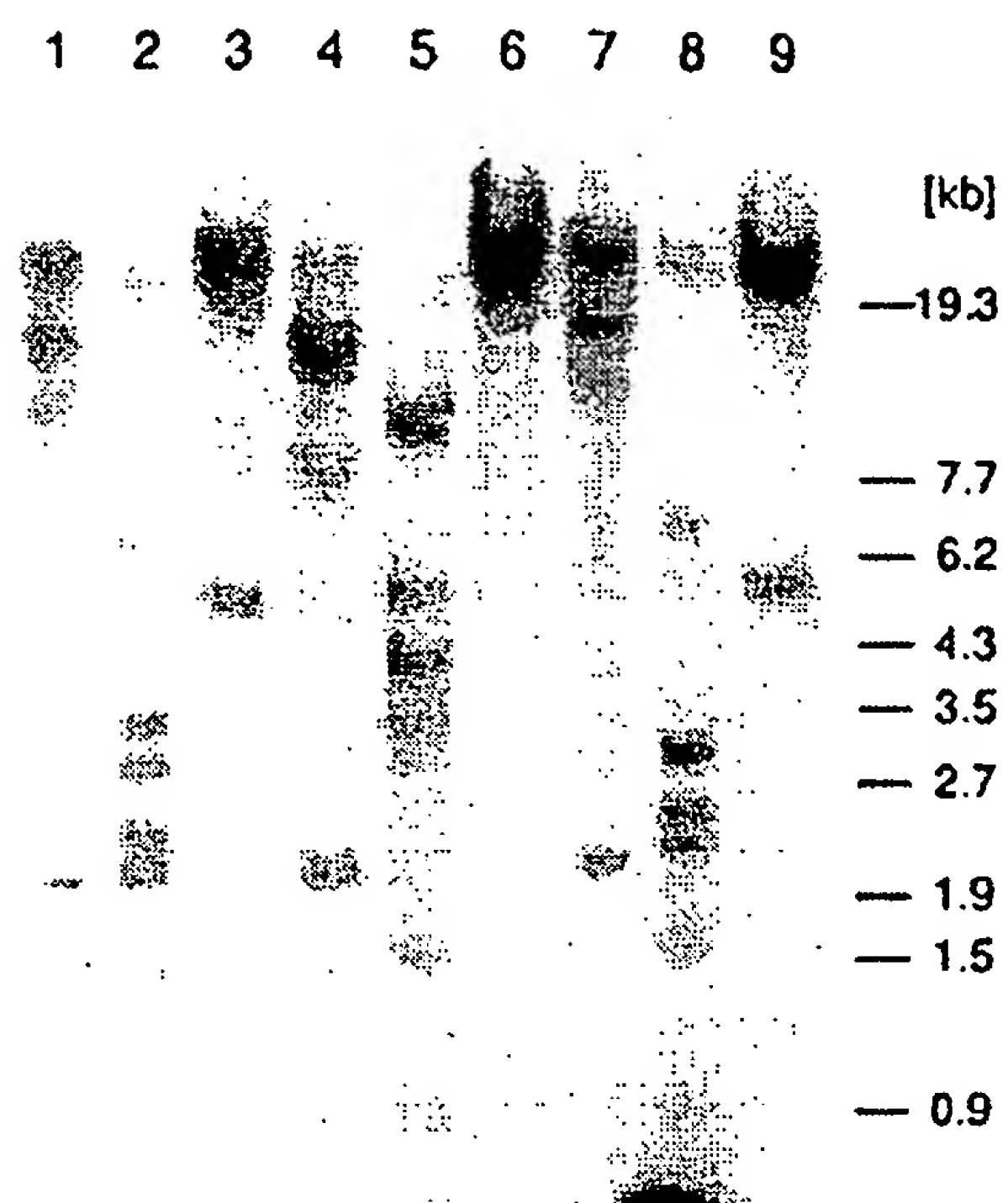


第11図

10 20 30 40 50 60  
CGGGGCAACT CAAGAAATTC AACAGCTGCA AGCGCGCCCC AGCCTCACAG CGCCAAGTGA  
70 80 90 100 110 120  
GCTATCGACG TGGTTGTGAG CGCTCGACGT GGTCCTACTGA CGGGCCTGTG AGCCTCTGCG  
130 140 150 160 170 180  
CTCCGTCCTC TGCCAAATCT CGCGTCGGGG CCTGCCTAAG TCGAAGATG CACGTGCGAT  
190 200 210 220 230 240  
CGGCACTAAT GTTCGAGCAG AAAGGCAGTG AGGCAGCTGC TTCCAGCCCA GACGTCTTGA  
250 260 270 280 290 300  
GAGCGTGGGC GACACAGTAT CACATGCCAT CCGAGTCGTC AGACGCAGCT CGTCCTGCGC  
310 320 330 340 350 360  
TAAAGCACGC CTACAAACCT CCAGCATCTG ACGCCAAGGG CATCACGATG GCGCTGACCA  
370 380 390 400 410 420  
TCATTGGCAC CTGGACCGCA GTGTTTTTAC ACGCAATATT TCAAATCAGG CTACCGACAT  
430 440 450 460 470 480  
CCTGGACCA GCTTCACTGG TTGCCTGTGT CCGAAGCCAC AGCCCAGCTT TTGGGCGGAA



第12図



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP95/01640

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C1<sup>6</sup> C12N15/53, C12N9/02, C12P7/26, C12N1/21

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C1<sup>6</sup> C12N15/53, C12N1/21, C12N9/02, C12P7/26

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE, BIOSIS, WPI/WPIL

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.                       |
|-----------|--|---|
| A         | WO, 9406918, A (Gist-Brocades NV.),<br>March 31, 1994 (31. 03. 94)<br>& EP, 586751, A & JP, 7-501225, A  | 1 - 23                                      |
| A         | EP, 474347, A (Uniliver Plc, Quest Int. BV.),<br>March 11, 1992 (11. 03. 92)<br>& JP, 5-076347, A  | 1 - 23                                      |
| PX<br>PA  | FEBS Lett. Vol. 364, No. 2 (1995), Lotan T et al., "Cloning and expression in Escherichia Coli of the gene encoding beta-C-4-oxygenase, that converts beta-carotene to the Ketocarotenoid Canthaxanthin in Haematococcus pluvialis" p. 125-128 | 1, 5-8, 16-19,<br>21-23<br>2-4,<br>9-15, 20 |
| PX<br>PA  | WO, 9518220, A (KIRIN Beer KK),<br>July 6, 1995 (06. 07. 95)   | 1, 5-8, 16-19,<br>21-23<br>2-4,<br>9-15, 20 |
| A         | Biotechnology Techniques Vol. 8, No. 1 (1994),   | 1 - 26                                      |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
November 14, 1995 (14. 11. 95)Date of mailing of the international search report  
November 28, 1995 (28. 11. 95)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office  
Facsimile No.Authorized officer  
Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP95/01640

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
|           | <p>Meyer P. S. et al., "Genetic analysis of astaxanthin-Overproducing mutants of Phaffia rhodozyma using RAPDs" p. 1-6</p> |                       |

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12N15/53, C12N9/02, C12P7/26,  
C12N1/21

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12N15/53, C12N1/21, C12N9/02,  
C12P7/26

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE, BIOSIS, WPI/WPIL

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示   | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| A               | WO, 9406918, A (Gist-Brocades NV.),<br>31. 3月. 1994 (31. 03. 94)<br>& EP, 586751, A & JP, 7-501225, A | 1-23             |
| A               | EP, 474347, A (Uniliver Plc, Quest Int.<br>BV.),<br>11. 3月. 1992 (11. 03. 92)<br>& JP, 5-076347, A    | 1-23             |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日  
若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献  
(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日  
の後に公表された文献「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と  
矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のため  
に引用するもの「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規  
性又は進歩性がないと考えられるもの「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文  
献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性  
がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14. 11. 95

国際調査報告の発送日

28.11.95

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

谷口 博

4 B 9 3 5 9

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

## C (続き). 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号                                       |
|-----------------|--|--|
| PX<br>PA        | FEBS Lett. 第364巻, 第2号(1995),<br>Lotan T et al., [Cloning and expression<br>in Escherichia Coli of the gene encoding<br>beta-C-4-oxygenase, that converts beta-<br>carotene to the Ketocarotenoid<br>Canthaxanthin in Haematococcus pluvialis]<br>p.125-128 | 1, 5-8,<br>16-19, 21-23<br><del>2-4, 9-15,</del><br>20 |
| PX<br>PA        | WO, 9518220, A(KIRIN Beer KK),<br>6. 7月. 1995(06. 07. 95)  | 1, 5-8,<br>16-19, 21-23<br><del>2-4, 9-15,</del><br>20 |
| A               | Biotechnology Techniques 第8巻, 第1号<br>(1994), Meyer P. S. et al., [Genetic<br>analysis of astaxanthin-Overproducing<br>mutants of Phaffia rhodozyma using<br>RAPDs] p.1-6   | 1-26   |